

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
Departamento de Psicobiología



TESIS DOCTORAL

**Marcadores biológicos en trastornos por uso de alcohol y comorbilidad
psiquiátrica asociada**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria García Marchena

Directores

Antonia Serrano Criado
Fernando Rodríguez de Fonseca

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Psicología
Departamento de Psicobiología



Facultad de Psicología
UCM



“Marcadores biológicos en trastornos por uso de alcohol y comorbilidad psiquiátrica asociada”

TESIS DOCTORAL

Nuria García Marchena

Madrid, octubre 2016



“Marcadores biológicos en trastornos por uso de alcohol y comorbilidad psiquiátrica asociada”

Tesis doctoral presentada por Nuria García Marchena para
optar a grado de Doctor en Psicología por la Universidad
Complutense de Madrid, bajo la dirección de los doctores

**Dra. Antonia Serrano
Criado**

**Dr. Fernando Rodríguez
de Fonseca**

Este trabajo ha sido financiado por:

Ministerio de Economía y Competitividad e Instituto de Salud Carlos III (PI13/02261)

Instituto de Salud Carlos III y UE-FEDER (Subprograma RETICS Red de Trastornos Adictivos RD12/0028/0001)

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Plan Nacional sobre Drogas (049/2013)

Junta de Andalucía, Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI CTS-433)

Junta de Andalucía-Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (PI45403)

Junta de Andalucía-Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales (PI-0823-2012)

Instituto de Salud Carlos III y UE-FEDER, Subprograma Estatal de Incorporación en el Sistema Nacional de Salud Miguel Servet tipo-I (CP14/00173).

Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid.

Dra. Antonia Serrano Criado, Investigadora Miguel Servet I UGC Salud Mental- Neuropsicofarmacología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

Certifican:

Que la licenciada en psicología Doña Nuria García Marchena ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos clínico-experimentales por los cuales se ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada: “Marcadores biológicos en trastornos por uso de alcohol y comorbilidad psiquiátrica asociada”.

Considerando que tanto el contenido científico como la presentación de la misma, reúnen las condiciones necesarias para su defensa y opción al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente certificado.

Málaga, 15 octubre 2016

Directores de Tesis

**Fdo. Dra. Antonia Serrano
Criado**

**Fdo. Dr. Fernando Rodríguez
de Fonseca**

Yo, Nuria García Marchena, declaro ser la autora de la presente Tesis Doctoral y trabajo de Investigación realizado en la Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental- Neuropsicofarmacología, Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA) de Málaga bajo la dirección de la Dra. Antonia Serrano Criado y del Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado

En Madrid, 15 de octubre 2016

Fdo. Nuria García Marchena

*A Zuriñe, mi cómplice de ilusión.
Abuelo, te echo de menos.*

Antes que nada, decir que siento profunda gratitud hacia todas las personas que, de una manera desinteresadamente generosa, compartieron su tiempo y su historia personal a favor del conocimiento general. Gracias de corazón a cada paciente que he tenido la oportunidad de conocer, os llevo siempre conmigo.

Por la confianza depositada y por ensancharme el corazón cada día, quiero dar las gracias a las personas que forman parte de mi vida y sin las que no sería la persona que soy hoy:

A los incondicionales, mis padres, por la infinita paciencia. Mamá, eres ternura y fuerza vital. Papá, eres mi refugio en el caos. Al resto de mi ruidosa y gran familia, juntarnos es alegría y ganas de vivir. Tía Mari, tía Roge y tío Víctor, vuestro amor es tan fuerte que no entiende de kilómetros.

A mis personas preferidas del universo, Silvia, Cris, Mari y Marta por cada segundo de vuestra sincera amistad, sois mi familia elegida. A mis amigas Bea, Alba, Raquel, Elena y Laura porque junto a ellas aprendí a amar mi profesión y a compartir celebrando cada pequeño triunfo. A Diana, Sergio, Santi, Paula y Naiara, por ser y estar sin importar el tiempo ni el lugar.

Además es preciso, agradecer el trabajo realizado junto a todos profesionales con los que he tenido la suerte de poder colaborar en estos años. Un agradecimiento especial a los siguientes:

De Madrid, al departamento de Psicobiología de la facultad y a Daniel Silva por el trabajo realizado y las ganas de mejorar aprendiendo día a día. Quiero agradecer al área de psiquiatría del Hospital 12 de Octubre liderado por el Doctor Rubio, porque me han hecho sentir como en casa. Especialmente a Guillermo Ponce, por su delicioso trabajo en terapia de grupos y por enseñarme todo lo que sé sobre esta enfermedad.

De Málaga, al laboratorio completo del IBIMA y concretamente a mis compañeros Javier Pavón, María Pedraz, Pablo Romero y Pedro Araos, este trabajo también es vuestro. Y, por último, a mis sufridos directores de tesis por el esfuerzo empleado en que todo salga bien. A Toñi, mi referente a seguir en la carrera científica, por el cariño y la confianza depositada en momentos clave. A Fernando, profesor y mentor, que me explicó que la tesis era un proceso de aprendizaje vital, cuyo secreto consistía en atreverse a imaginar y reponerse rápido tras cada tropiezo. Gracias a ambos por mostrarme el mundo y por enseñarme a volar.

PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL EN FORMATO PUBLICACIONES

Esta Tesis Doctoral se presenta como compendio de publicaciones originales según la normativa aprobada por la Junta de Facultad el 17 de abril de 2015 en el desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero (BOE 10/02/2011) que regula los estudios de doctorado en la UCM (acuerdo de Consejo de Gobierno de 6 de noviembre de 2012, publicado en el BOUC 14, de 21/12/2012) que permite la presentación de Tesis Doctorales como compendio de publicaciones.

Este trabajo incluye una introducción general a las publicaciones, un apartado de hipótesis y objetivos en el que se justifica la hipótesis de trabajo y los objetivos de la investigación, una metodología general y específica de los artículos, un apartado de publicaciones en el que se insertan los artículos originales o aceptados para su revisión, una discusión general integradora de las mismas y un apartado con conclusiones específicas y generales.

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en la línea de investigación del **estudio de marcadores biológicos implicados en los procesos de adicción y neuroinflamación**, se han realizado los siguientes trabajos de los que se han derivado las siguientes publicaciones:

1. **García-Marchena N**, Araos P, Pavón JF, Ponce G, Pedraz M, Serrano A, Arias F, Romero-Sanchiz P, Suarez J, Pastor A, de La Torre R, Torrens M, Rubio G, Rodríguez de Fonseca F (2016). Psychiatric comorbidity and plasma levels of 2-acyl-glycerols in outpatient treatment alcohol users. Analysis of gender differences. Adicciones [Epub ahead of print].
2. **García-Marchena N**, Pavón FJ, Pastor A, Araos P, Pedraz M, Romero-Sanchiz P, Calado M, Suarez J, Castilla-Ortega E, Orio L, Boronat A, Torrens M, Rubio G, de la Torre R, Rodríguez de Fonseca F, Serrano A (2016). Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence. Addict Biol. 2016 May 22. doi: 10.1111/adb.12408. [Epubahead of print].
3. **García-Marchena N**, Araos P, Barrios V, Chowen JA, Sánchez-Marin L, Chowen JA, Pedraz M, Serrano A, Castilla-Ortega E, Ponce G, Gavito AL, Decara J, Silva D, Torrens M, Argente J, Rubio G, Serrano A, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca, F (2016). Plasma chemokines in patients with alcohol use disorders: Association CCL11 (Eotaxin-1) with psychiatric comorbidity.

MARCADORES BIOLÓGICOS EN TRASTORNOS POR USO DE ALCOHOL Y COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA ASOCIADA

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo el estudio de los efectos del uso patológico de alcohol sobre la expresión en plasma de moléculas bioactivas de las familias de los acilglicerol, aciletanolamidas y quimioquinas, y su asociación con la presencia de comorbilidad psiquiátrica. Su fin último es la mejora de las herramientas diagnósticas y terapéuticas que existen en la actualidad y que han demostrado tener una baja eficacia en el abordaje asistencial de pacientes con trastorno por uso de alcohol asociados a comorbilidad psiquiátrica.

Para conseguir este objetivo, se realizó una evaluación clínica exhaustiva de sintomatología de trastornos por uso de sustancias y de otros trastornos psiquiátricos en una muestra de pacientes con trastornos por uso de alcohol procedentes de un centro asistencial hospitalario y de un grupo control de voluntarios sanos del entorno sanitario pareado por edad, sexo e índice de masa corporal. Se recogieron muestras de sangre de cada paciente y control que se procesaron para la medición de potenciales marcadores biológicos de adicción al alcohol en plasma. Además, se realizó una validación en modelo animal de algunos hallazgos realizados en el estudio clínico en quimioquinas.

En el primer estudio se estiman las prevalencias de comorbilidad psiquiátrica y de trastornos por uso de otras sustancias evaluando las diferencias entre hombres y mujeres en patrones de uso de alcohol. La psicopatología estaba asociada a un mayor número de criterios de abuso y dependencia de alcohol. Se obtuvo una prevalencia elevada en comorbilidad psiquiátrica (68,5%) destacando los trastornos del estado de ánimo (45,7%), los trastornos de personalidad (24,1%) y los trastornos de ansiedad (19,8%). Las mujeres muestran mayores prevalencias en diagnósticos del estado de ánimo. Las concentraciones de monoacilglicerol 2-araquidonilglicerol (2-AG) y 2-oleoilglicerol (2-OG) se encontraron disminuidas significativamente en pacientes con trastornos de ansiedad diagnosticados en el último año.

En el segundo estudio se caracterizaron los niveles de determinadas aciletanolamidas en pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia y el grupo control. Los niveles de aciletanolamidas están significativamente aumentados debido al consumo y se desarrolló un modelo logístico con un alto poder discriminativo en el consumo de alcohol utilizando como variables predictoras las concentraciones plasmáticas de Oleiletanolamida (OEA), Anandamida (AEA) y Docosatetraenoiletanolamida (DEA). Además, mediante un modelo de regresión se encontró un efecto significativo del tiempo de abstinencia en las concentraciones de OEA, AEA y DEA que pueden convertirse en biomarcadores de la duración de la abstinencia. Estos resultados apoyan a los estudios preclínicos que sugerían que determinadas aciletanolamidas estaban alteradas durante la abstinencia actuando como potenciales biomarcadores de consumo de alcohol.

En el tercer estudio se caracterizaron los niveles plasmáticos de determinadas quimioquinas en los trastornos por uso de alcohol. Se obtuvo alta comorbilidad en trastornos por uso de otras sustancias (45%) y en comorbilidad psiquiátrica (72%). Las concentraciones de determinadas quimioquinas se ven afectadas por dimorfismo sexual, especialmente en Eotaxina-1 (CCL11). Las concentraciones de las quimioquinas [SDF-1 (CXCL12) y Fractalquina (CX₃CL1)] están disminuidas en el grupo alcohol en comparación con los controles, mientras que las concentraciones de CCL11 son menores en pacientes mujeres. Las concentraciones de IL-8 estaban aumentadas en mujeres con comorbilidad médica digestiva. Los pacientes con trastornos afectivos y con trastornos de ansiedad tenían menores concentraciones de Eotaxina-1 que los pacientes sin comorbilidad psiquiátrica. El estudio con ratas expuestas a etanol durante 4 semanas revelan cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de SDF-1, pero no en Fractalquina durante la abstinencia. Las ratas expuestas a etanol y a estrés temprano (en restricción) muestran cambios en las concentraciones de Eotaxina-1.

La medición objetiva de moléculas circulantes en pacientes con adicción ayuda a la comprensión de los procesos de regulación homeostática interna, incluyendo los procesos inflamatorios (neuroinflamación) que empiezan a describirse como subyacentes a la enfermedad mental. Estudios exploratorios como la presente investigación, basada en estudios experimentales previos, aportan un nivel traslacional a la investigación basada en modelos clínicos y son de gran ayuda en la búsqueda de mejoras terapéuticas.

BIOLOGICAL MARKERS IN ALCOHOL USE DISORDERS AND ASSOCIATED PSYCHIATRIC COMORBIDITY

The main objective of the present Doctoral Thesis is to study the effects of the pathological use of alcohol on the plasma concentrations of several bioactive molecules related to motivated behaviors, emotional control and inflammation. These molecules are 2-acyl-glycerols, acylethanolamines and chemokines. They were also analyzed as potential biomarkers of associated psychiatric comorbidity. The ultimate goal is to improve diagnostic tools and therapeutic interventions in alcohol addiction use disorders complicated by the presence of comorbid psychiatric diseases.

To achieve this goal, exhaustive psychiatric interviews have been performed to gather information on sociodemographic data, patterns of consumption of substances and diagnosis of comorbid psychiatric disorders. This study was done in a sample of participants recruited from an outpatient treatment program and an age/sex/body mass-matched group of healthy volunteers. Blood samples from every patient and control were collected for the quantification in plasma of potential biomarkers of alcohol addiction/psychiatric comorbidity. Besides, a validation an animal model of alcohol-induced alteration in circulating chemokines was also explored.

In the first study, we estimated the prevalence of psychiatric comorbidity and others substance use disorders evaluating gender differences in the alcohol consumption pattern. Psychiatric comorbidity was associated with the number of abuse and dependence criteria in the most severe episode. The prevalence of lifetime psychiatric comorbidity was found to be high (58,5%), highlighting mood disorders (45,7%), personality disorders (24,1%) and anxiety disorders (19,8%). Women showed higher prevalences in mood disorders than men. Plasma concentrations of 2-acyl-glycerols [2-araquidonil-glycerol (2-AG) and 2-linoleoyl-glycerol (2-OG)] were significantly lower in patients with anxiety disorders in the last year.

In the second study, we characterized the plasma concentrations of acylethanolamides in alcohol use disorders patients and in a control group. Acylethanolamides were increased in alcohol-dependent patients and we developed a logistic model providing a high discriminatory power with the alcohol consumption using the concentrations of OEA, AEA and DEA as predictors. After a regression model, we found a significative effect on alcohol abstinence in OEA, AEA, and DEA concentrations as makers of abstinence duration. The present findings support preclinical studies that acylethanolamides are associated with a history of alcohol consumption and abstinence.

In the third study, we characterized the plasma profile of chemokines in alcohol use disorders. Abstinent patients with alcohol use disorders displayed a high prevalence of comorbid mental disorders (72%) and other substance use disorders (45%). Plasma concentrations of chemokines were affected by sexual dimorphism, specially in Eotaxin-1 (CCL11). CXCL12 (SDF-1) and Fractalkine (CX₃CL1) were lower in patients with alcohol use disorders compare to control group, whereas CCL11 concentrations were lower in women. CXCL8 (IL-8) concentrations were higher in female patients with cirrhosis, steatosis or pancreatitis. CCL11 concentrations were lower in patients with alcohol use disorders with comorbid mood and anxiety disorders compared to patients without mental disorders. Studied conducted in male rats exposed to repeated ethanol administration during 4 weeks displayed significant changes in CXCL12 (SDF-1) concentrations but no changes in CX₃CL1 during abstinence. Rats exposed to repeated ethanol and early stress revealed changes in CCL11 concentrations.

The positive findings on the existence of a link in between alcohol use disorder and plasma concentrations of bioactive molecules emphasizes the importance of understanding the underlying homeostatic responses that define the addicted phenotype, including responses related to inflammation. This research will help to understand the underlying processes that lead to alcohol addiction and psychiatric comorbidity. The present findings in humans were extended to animal models, a very important fact to improve the translational value of clinical research.

•INDICE GENERAL•

Relación de tablas

Relación de figuras

Abreviaturas

Prefacio

1. Introducción.....	1
1.1. Repercusión del problema.....	2
1.1.1. Epidemiología de los trastornos por uso de alcohol.....	2
1.1.2. Epidemiología de los trastornos por uso de alcohol en España.....	3
1.1.3. Consumo de alcohol en jóvenes y adolescentes.....	4
1.1.4. Diferencias sexuales en los trastornos por uso de alcohol	5
1.2. La adicción al alcohol.....	6
1.2.1. Trastornos por uso de alcohol.....	9
1.2.2. Neurobiología de los trastornos por uso de alcohol.....	16
1.2.2.1. Sistema cerebral de recompensa.....	16
1.2.2.2. Cambios neurobiológicos en el proceso de adicción.....	19
1.3. Comorbilidad psiquiátrica en los trastornos por uso de alcohol.....	22
1.3.1. Trastornos del estado de ánimo.....	24
1.3.2. Trastornos de ansiedad.....	25
1.3.3. Trastornos psicóticos.....	25
1.3.4. Trastornos de la personalidad.....	26
1.3.5. Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH).....	28
1.4. Instrumentos de evaluación psiquiátrica.....	29
1.4.1. Manuales diagnósticos.....	29
1.4.2. Instrumentos diagnósticos específicos en adicciones.....	30
1.5. Marcadores biológicos relacionados con la adicción.....	33
1.5.1. Sistema endocannabinoide.....	34
1.5.2. Monoacilgliceroles.....	36
1.5.2.1. Papel de los monoacilgliceroles en adicciones.....	38
1.5.3. Aciletanolamidas.....	39
1.5.3.1. Papel de las aciletanolamidas en adicciones.....	42
1.5.4. Quimioquinas.....	46
1.5.4.1. Papel de las quimioquinas en adicciones.....	49
2. Hipótesis y objetivos.....	54
2.1. Hipótesis general de la tesis.....	55
2.1.1. Hipótesis estudio I.....	55
2.1.2. Hipótesis estudio II.....	55
2.1.3. Hipótesis estudio III.....	56
2.2. Objetivos generales de la tesis.....	56
2.2.1. Objetivos específicos estudio I.....	57
2.2.2. Objetivos específicos estudio II.....	57
2.2.3. Objetivos específicos estudio III.....	57

3. Metodología	58
3.1. Diseño general de los experimentos	59
3.1.1. Diseño clínico	59
3.1.1.1. Descripción de los distintos estudios	60
3.1.1.2. Criterios de participación	60
3.1.2. Diseño animal	62
3.2. Aspectos éticos	62
3.2.1. Aspectos éticos de los estudios clínicos	62
3.2.2. Aspectos éticos del estudio experimental	62
3.3. Evaluación clínica	63
3.3.1. Gravedad media en los criterios de adicción al alcohol	66
3.3.2. Evaluación de la comorbilidad psiquiátrica	66
3.4. Procedimiento experimental de la exposición a alcohol en modelos animales	69
3.5. Determinación de parámetros bioquímicos	69
3.5.1. Diseño clínico	69
3.5.1.1. Cuantificación de mediadores lipídicos	70
3.5.1.2. Cuantificación de mediadores inflamatorios	71
3.5.2. Diseño experimental	72
3.6. Análisis estadístico	72
3.6.1. Estadística Estudio I	73
3.6.2. Estadística Estudio II	74
3.6.3. Estadística Estudio III	75
4. Resultados	76
4.1. Estudio I: <i>“Comorbilidad psiquiátrica y valores plasmáticos de 2-acilgliceroles en consumidores de alcohol en tratamiento ambulatorio. Análisis de las diferencias de género”</i>	77
4.2. Estudio II: <i>“Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence”</i>	92
4.3. Estudio III: <i>“Plasma chemokines in patients with alcohol use disorders in abstinence: Association of CCL11 (Eotaxin-1) with psychiatric comorbidity”</i>	105
5. Discusión	154
6. Conclusiones	169
7. Anexo	172
7.1. Publicaciones científicas	173
8. Referencias bibliográficas	174

•Relación de figuras•

Figura 1: Porcentaje de <i>binge</i> en menores (14-17 años) en el último mes según sexo y edad.....	5
Figura 2: Mecanismo de los procesos oponentes.....	7
Figura 3: Circuitos neuroquímicos en los sistemas de recompensa cerebral en TUA.....	18
Figura 4: Neuroplasticidad cerebral en el proceso de pérdida de control sobre la sustancia.....	19
Figura 5: Cambios en el circuito de adicción.....	20
Figura 6: Sistemas cerebrales implicados en la adicción.....	22
Figura 7: Test CAGE.....	30
Figura 8: Test AUDIT.....	31
Figura 9: Organización sináptica del sistema endocannabinoide.....	36
Figura 10: Principales monoacilgliceroles.....	36
Figura 11: Niveles plasmáticos de monoacilgliceroles (2-AG y 2-LG) en sujetos con trastornos por uso de cocaína abstinentes y controles.....	39
Figura 12: Principales aciletanolamidas.....	40
Figura 13: Sistema AEA/OEA como regulador del apetito.....	41
Figura 14: Efectos en los niveles plasmáticos de la administración aguda de etanol (a) y OEA (b) en ratas	42
Figura 15: Efectos en los niveles plasmáticos de la administración crónica de etanol (c) y de OEA (d) en ratas.....	43
Figura 16: Efectos de la OEA sobre el síndrome de privación alcohólica en medidas generales de abstinencia (a) y en cada síntoma (b).....	44
Figura 17: Niveles plasmáticos de POEA en mujeres y hombres con trastornos por uso de cocaína.....	45
Figura 18: Niveles plasmáticos de aciletanolamidas en sujetos con trastornos por uso de cocaína abstinentes y controles.....	45
Figura 19: Estructuras de las diferentes clases de quimioquinas.....	47
Figura 20: Vías de comunicación en el SNC	48
Figura 21: Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios de IL-1 β (a), fractalquina (b), SDF-1 (c) en tratamiento agudo y crónico.....	50
Figura 22: Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios en pacientes de cocaína abstinentes y controles (a) y curva ROC generada por un modelo logístico (b).....	51
Figura 23: Análisis de correlación entre mediadores pro-inflamatorios y número de criterios de adicción según el DSM-IV-TR.....	52
Figura 24: Esquema del procedimiento del diseño experimental.....	59
Figura 25: Descripción de la población y los criterios específicos de cada estudio.....	60
Figura 26: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno primario previo a la intoxicación crónica.....	64
Figura 27: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno primario posterior a la intoxicación crónica	64
Figura 28: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno inducido durante la intoxicación crónica.....	65
Figura 29: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno inducido en las dos semanas previas a la intoxicación.....	65
Figura 30: Niveles plasmáticos de 2-acilgliceroles (2-AG, 2-LG y 2-OG) en consumidores de alcohol agrupados por diagnósticos de trastornos de ansiedad (DSM-IV-TR).....	158

Figura 31: Niveles plasmáticos de aciletanolamidas (PEA, SEA, POEA, OEA, LEA, DGLEA, AEA, DEA, DHEA) en pacientes consumidores de alcohol en abstinencia y grupo control.....	160
Figura 32: Niveles plasmáticos de OEA, AEA y DEA en relación al tiempo de abstinencia de alcohol.....	162
Figura 33: Niveles plasmáticos de SDF-1 y Fractalquina en relación al consumo de alcohol.....	164
Figura 34: Niveles plasmáticos de Eotaxina-1 en relación a la comorbilidad psiquiátrica con trastornos por uso de sustancias y otros trastornos psiquiátricos.....	166
Figura 35: Niveles plasmáticos de Eotaxina-1 con respecto al consumo de alcohol entre hombres y mujeres.....	167

•Relación de tablas•

Tabla 1: Prevalencias de TUA en España.....	4
Tabla 2: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para la intoxicación por alcohol.....	10
Tabla 3: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para el abuso de sustancias.....	11
Tabla 4: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para la dependencia de sustancias.....	13
Tabla 5: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para la abstinencia de alcohol.....	14
Tabla 6: Efectos del alcohol en distintos sistemas.....	15
Tabla 7: Prevalencias de comorbilidad psiquiátrica en distintos estudios en población con TUA.....	23
Tabla 8: Mecanismos neurobiológicos implicados en los trastornos por uso de alcohol y trastornos psiquiátricos.....	24
Tabla 9: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para el Trastorno límite de la personalidad.....	27
Tabla 10: Criterios diagnósticos DSM-IV-TR para el Trastorno antisocial de la personalidad.....	28
Tabla 11: Variables socio-demográficas en función del sexo de una población TUA en tratamiento.....	157

•Abreviaturas•

AA	Ácido araquidónico
AEA	Araquidoniletanolamida o anandamida
AMP_c	Adenosin monofosfato cíclico
ATV	Área tegmental ventral
B₁	Vitamina tiamina
B₁₂	Vitamina cobalamina
Ca²⁺	Ión calcio
CB₁	Receptor cannabinoide de tipo 1
CB₂	Receptor cannabinoide de tipo 2
CCL2	Ligando 2 con el motivo C-C
CCL11	Ligando 11 con el motivo C-C o eotaxina-1
CIE-10	Versión décima de la clasificación internacional de enfermedades
CRF	Factor liberador de corticotropina
CXCL8	Ligando 8 con el motivo C-X-C
CXCL12	Ligando 12 con el motivo C-X-C
CX₃CL1	Ligando con el motivo C-X ₃ -C o fractalquina
DAG	1,2-Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol-lipasa
DEA	Docosatetraenoiletanolamida
DGLEA	Dihomo-γ-linolenioiletanolamida
DHEA	Docosahexaenoiletanolamida
DSM-IV-TR	<i>Manual of Mental Disorders. 4th edition. Text revisión</i>
DSM-V	<i>Manual of Mental Disorders. 5th edition</i>
ECA	<i>Epidemiologic Catchment Area</i>
eCBs	Endocannabinoides
ELR	Ácido glutámico-leucina-arginina
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre of Drugs and Drug Addiction</i>
ESTUDES	Encuesta sobre el uso de drogas en estudiantes de enseñanza secundaria
EPEA	N-eicosapentanoiletanolamida
ESTUDES	Encuesta sobre el uso de drogas en estudiantes de enseñanza secundaria
FAAH	Enzima amida hidrolasa de ácidos grasos
GABA	Receptor ionotrópico del ácido gamma-aminobutírico
HHa	Sistema hipotalámico-hipofisiario-adrenal
IL-1K⁺	Ión potasio
IL-1β	Interleukina 1beta
IL-6	Interleukina 6
IL-8	Interleukina 8
ISEP	Instituto superior de estudios psicológicos
LEA	Linoleiletanolamida
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAO	Monoaminoxidasa
MCP-1	Proteína 1 quimotáctica de monocitos
Na⁺	Ión sodio
NAc	Núcleo Accumbens
NADA	N-araquidonil-dopamina
NAPE	N- araquidonil-fosfatidiletanolamina
NMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropéptido Y
OEA	Oleiletanolamida
OEDT	Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEA	Palmitoiletanolamida
POEA	Palmitoleiletanolamida
PPAR-α	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo alfa

PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
ROC	Característica operativa del receptor
SDF-1	Derivado de células estromales
SEA	Esteariletanolamida
SEC	Sistema endocannabinoide
SNC	Sistema nervioso central
TDAH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
TDM	Trastorno depresivo mayor
TEPT	Trastorno por estrés post-traumático
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRPV1	Receptor de vanilloides tipo 1
TUA	Trastornos por uso de alcohol
TUS	Trastornos por uso de sustancias
UBE	Unidad de bebida estándar
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wy-14643	Agonista sintético del receptor PPAR α
2-AG	2 araquidonil glicerol
2-LG	2-linoleoilglicerol
2-OG	2-oleoilglicerol

Prefacio

En el desarrollo histórico asistencial y el tratamiento, a finales del siglo XIX, el uso excesivo de bebidas alcohólicas suscitó el interés sanitario, científico y social. Hasta pasados los años 60 del siglo XX, con la “despsiquiatrización” del alcoholismo, no se sintió la necesidad de la diversificación asistencial de la psiquiatría general. Las conductas adictivas con relación al alcohol se relacionaban con alteraciones y anomalías de la personalidad, su asistencia quedaba reducida su asistencia a la desintoxicación inmediata parcial para aquellos pacientes con complicaciones graves (*delirium tremens*) o sociales (conductas agresivas), siendo separados de los pacientes con patología orgánica médica (hepatopatías). En los años 50 aumentó el consumo y las hospitalizaciones, esto generó los primeros estudios epidemiológicos sobre alcoholismo en 1966 y determinó consideraciones específicas como extensiones de los dispositivos asistenciales extrahospitalarios con programas sanitarios específicos de los trastornos de uso de alcohol. En los años 70, el desarrollo industrial y emigración dieron cambio a las características de los patrones de consumo de alcohol, tanto en cantidad como en calidad. En los años 80 y 90 se crearon en el sector público programas asistenciales y preventivos de forma heterogénea, debido a la radicalización del consumo de alcohol y al policonsumo de sustancias. Durante la primera década del siglo XXI los sistemas de salud de los países desarrollados tomaron conciencia del problema sanitario que suponía el alcoholismo como enfermedad, esto dio lugar no solo a nuevas terapias farmacológicas, sino a un interés creciente por acabar con la marginalización que suponía el consumo de alcohol, lo que dio lugar a la incorporación de esta enfermedad bajo el término Trastornos Por Uso de Alcohol, y a su incorporación progresiva a las prestaciones sanitarias. Actualmente, sigue siendo un grave problema sanitario y social, y los recursos técnicos, económicos y políticos disponibles deben potenciar las posibilidades de una integración conjunta hacia las medidas necesarias preventivas y de tratamiento sanitario. Bajo este marco, la mejora de la clasificación diagnóstica y terapéutica de los pacientes, con la ayuda de una fenotipación biológica específica, se convierte en una prioridad para su correcta asistencia sanitaria.

1. Introducción

1.1. Repercusión del problema

1.1.1. Epidemiología de los trastornos por uso de alcohol

Para poder profundizar en el conocimiento de los trastornos por uso de alcohol (TUA) es fundamental describir tanto la magnitud como la compleja epidemiología de este trastorno. En el mundo cada año se producen 3,3 millones de muertes en las que interviene el consumo de alcohol, lo que representa un 5,9% de las defunciones mundiales. El consumo de alcohol es un factor causal de más de 200 enfermedades y trastornos que provocan incapacidad a una edad relativamente temprana. En la franja de edad de 20 a 39 años, el 25% de las defunciones son atribuibles a esta sustancia, existiendo una relación causal entre el consumo de alcohol y trastornos mentales y comportamentales, así como enfermedades no transmisibles (cirrosis hepática, cáncer y enfermedades cardiovasculares) y traumatismos (accidentabilidad), además de facilitar la incidencia de enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Una de las dificultades para analizar los efectos del alcohol es la enorme variedad de modos de consumo que obliga a una estandarización del mismo para comparar los estudios epidemiológicos. Para determinar el consumo de alcohol de una persona se estandarizan y cuantifican los gramos absolutos de alcohol en unidades de bebida estándar (UBE) (Griffith, 2003). La UBE es el volumen en litros multiplicado por el porcentaje de alcohol que contiene la bebida y multiplicado de nuevo por 0,8 (un mililitro de alcohol contiene 0,785 g de alcohol). En Europa una UBE representa 10 g de alcohol. Con esta estandarización podemos decir que en 2010, el consumo de alcohol per cápita en todo el mundo registró un promedio de 21,2 l de alcohol puro entre los hombres y 8,9 l de alcohol puro entre las mujeres (WHO, 2014).

Cuando en la literatura se hace referencia a un consumo de alto riesgo, se refiere a un consumo que implica una ingesta diaria superior a 40 g de etanol (4 UBEs) para hombres y superior a 30 g (3 UBEs) para mujeres y/o 28 UBEs semanales para hombres y 17 UBEs semanales para mujeres. Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), un consumo esporádico superior de 60 g en hombres y de 40 g en mujeres también implicaría consumo de riesgo o *heavy episode drinking* (WHO, 2002).

Sin embargo consumos inferiores a los indicados no indican ausencia de riesgos para la salud ya que hay que tener en cuenta aspectos cualitativos del consumo como beber en situaciones de ansiedad o depresión, o con el objetivo de alcanzar los efectos psicoactivos del alcohol o los factores individuales de cada consumidor. La combinación de alta morbilidad y alta mortalidad unidas a una baja conciencia de enfermedad, tanto a nivel social como individual, genera una situación en la que un gran número de personas en situación de riesgo no siente la necesidad de demandar ayuda en lo que a su consumo de alcohol se refiere y por lo tanto no acudirá a los centros de atención sanitaria. Esto es especialmente relevante en el caso de las mujeres fértiles en las que mínimas cantidades de alcohol consumidas

durante la gestación pueden ocasionar daños a muy largo plazo, como los definidos en el síndrome del espectro del alcohol fetal.

Los pacientes que acceden a servicios de tratamiento en Europa tienen distintas necesidades y requieren intervenciones que han de abordar una compleja gama de problemas. Dado que la mayoría de las personas que inician un tratamiento de drogodependencia probablemente consuman más de una sustancia, y algunas quizá tengan problemas con varias sustancias, son importantes los planes de evaluación de los servicios y de tratamiento que aborden la poli-toxicomanía, considerando especialmente que el consumo de alcohol es prácticamente un factor común en todas ellas.

Otro aspecto de salud muy relevante al estudiar el trastorno por uso de alcohol es la presencia de trastornos mentales adicionales, bien primarios o inducidos por esta sustancia. Se sabe desde hace tiempo que existe una asociación entre algunos trastornos mentales y los trastornos relacionados con sustancias. La comorbilidad psiquiátrica en pacientes con adicciones es un desafío tanto para los servicios de drogodependencia como para los de salud mental. En una revisión reciente, las comorbilidades más frecuentes entre los consumidores de sustancias ilegales fueron depresión mayor, trastornos de ansiedad (fundamentalmente trastornos de angustia y estrés postraumático) y trastornos de la personalidad (principalmente trastornos asociales y trastorno límite de la personalidad). A pesar de la importancia de esta cuestión, resulta difícil determinar el alcance del problema, porque los datos disponibles son limitados y heterogéneos.

Existen indicios de que las mujeres sometidas a tratamiento de drogodependencia pueden tener necesidades más complejas, sobre todo en relación con la comorbilidad y las responsabilidades, necesitando servicios más específicos desde una perspectiva de género. Aunque en total las mujeres solo representan el 20 % de los pacientes que inician tratamiento especializado (es decir, la relación entre hombres y mujeres es de 4 a 1), esta diferencia varía según los países, oscilando entre el 5 % y el 34 %, y es menos marcada entre los pacientes que reciben tratamiento por primera vez. Los motivos de que sean menos las mujeres que los hombres que reciben tratamiento de la drogodependencia son variados; pueden incluirse aquí las diferencias entre los dos sexos en la prevalencia de consumo problemático o en notificación del mismo, y las cuestiones referidas al acceso y la idoneidad de la prestación del servicio (EMCDDA, 2016).

1.1.2. Epidemiología de los trastornos por uso de alcohol en España

En nuestro país las drogas más consumidas son las legales, en primer lugar se encuentra el alcohol seguido del tabaco, mientras que la droga ilegal con mayor prevalencia es el cannabis seguido de la cocaína. Se calcula que un 65% de la población española consume de forma regular bebidas alcohólicas, y un 50% de los bebedores de riesgo cumplen criterios de dependencia. Las prevalencias de trastornos por uso de alcohol separados por sexos se pueden ver en la Tabla 1. Siete de cada diez españoles han tomado bebidas alcohólicas en el último mes y así

el 5% hace un consumo de riesgo de alcohol. El uso de drogas tanto legales como ilegales está más extendido entre los hombres, excepto los hipnosedantes que son consumidos por una mayor proporción de mujeres. Los jóvenes hacen más consumos intensivos de alcohol y fuman cannabis en mayor proporción que el resto de la población.

Tabla1: Prevalencias de TUA en España. Adaptación WHO, 2010

Prevalencia de trastornos por uso de alcohol 2010* (%)		
	Trastornos por uso de alcohol	Dependencia de alcohol
Hombres	2,3	1,2
Mujeres	0,4	0,2
Ambos sexos	1,3	0,7
*Prevalencia estimada en 12 meses (+ de 15 años)		
**Incluye abuso y dependencia		

En el año 2013, el 10,5% de la población de 16 a 64 años había consumido alcohol en los últimos 30 días, mientras que el 4,8% presentaba consumo de riesgo. El grupo más vulnerable son los menores de 25 años con bajo nivel educativo y solteros. Los mayores de 45 años con bajo nivel educativo (sin estudios o con estudios primarios/secundarios) son los perfiles de consumo más elevado, pertenecientes a sectores de la construcción, agricultura, industria manufacturera y hostelería. Por lo tanto, los hombres consumen alcohol a diario en mayor proporción que las mujeres (4 a 1) y la prevalencia de consumo aumenta con la edad (los mayores consumos se dan entre los 55 y los 64 años). Los menores porcentajes se registran entre aquellos con mayor nivel educativo y entre los solteros.

Existen diferencias importantes en el grupo de edad, hay mayor porcentaje de personas mayores de 45 años entre los consumidores diarios, mientras que los menores de 25 años alcanzan las mayores proporciones entre los consumidores de alcohol en riesgo. El hecho de no estar casado o no vivir en pareja, una situación laboral de desempleo y la categoría ocupacional aumenta la probabilidad de tener un consumo de alcohol en riesgo (OEDT, 2013).

1.1.3. Consumo de alcohol en jóvenes y adolescentes

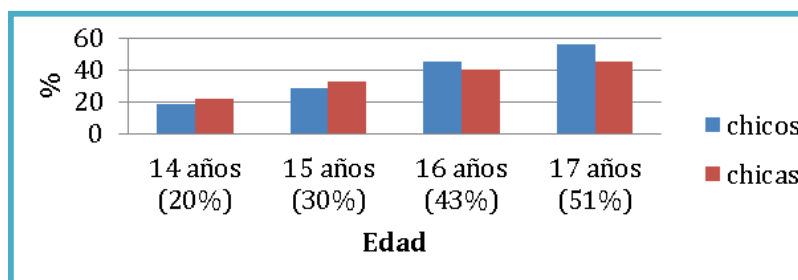
En nuestro país la edad media de inicio al consumo de alcohol es de 13,9 años. El 81,9% de los consumidores de 14 a 18 años, ha consumido en el último año y el 74% en el último mes. Como se puede apreciar en la Figura 1, la mitad de los jóvenes de 17 años ha consumido en forma de atracón en el último mes.

El patrón de consumo de alcohol en atracón (*binge drinking*) consiste en la ingesta de bebidas alcohólicas en grandes cantidades y durante un corto periodo de tiempo (3 o más bebidas en un periodo corto de 1-2 horas), con la intención de alcanzar el estado de intoxicación etílica (Courtney, 2009). El número de intoxicaciones agudas de alcohol está siendo un importante problema de salud

pública en Europa en los últimos años porque este tipo de patrón de consumo se asocia a problemas psicosociales graves, especialmente en relación con los comportamientos agresivos-disociales (Diestelkamp et al., 2015).

1.1.4. Diferencias sexuales en los trastornos por uso de alcohol

Figura 1: Porcentaje de consumo en atracón en menores (14-17 años) en el último mes según sexo y edad. Fuente: ESTUDES, 2013.



Aunque la proporción de mujeres que acude a tratamiento es de 1 mujer por cada 4 hombres, el consumo de alcohol entre mujeres ha aumentado y comparte características comunes con el patrón masculino pero también tiene aspectos diferenciales que hay que tener en cuenta a la hora de plantear el tratamiento. Algunos estudios indican que el porcentaje de pacientes no detectados que acuden a consulta de atención primaria con problemas relacionados con el consumo de alcohol son un 21% hombres y un 41% en mujeres (Malet, 2003; Weisner, 2003).

El perfil de la mujer con TUA se caracteriza por tener una media de 40 años, generalmente casada, con estudios primarios y ama de casa. Algunos autores han definido las características específicas como un telescopaje o curso diferido del TUA femenino (es decir, un comienzo a una edad más tardía, con una afectación somática y socio-familiar mayor que la de los hombres y con un consumo medio de alcohol inferior). Por ello, entre las características diferenciales con los hombres, ellas inician el consumo de alcohol a una edad más tardía, y tardan menos tiempo en desarrollar un TUA. En las mujeres se detecta la enfermedad cuando el patrón de consumo es más problemático aunque lleven menor número de años con el trastorno y menos gramos de alcohol consumidos (Ávila Escribano, 2007), ya que el hígado femenino es menor y el cuerpo de la mujer tiene una cantidad menor de grasa. Además, se han descrito una serie de factores etiológicos de riesgo de padecer TUA en mujeres: el abuso de alcohol por parte de la pareja, padecer trastornos de ánimo comórbidos, la existencia de abusos sexuales en la infancia y malos tratos en la niñez o adultez (Wilsnack, 1994).

El consumo elevado de alcohol se correlaciona con comorbilidad médica como hepatopatías y cáncer de mama debido a un déficit de ácido fólico (Jiang et al., 2003) y a la capacidad mutagénica directa del alcohol y su principal metabolito, el acetaldehído. En cuanto a diferencias en comorbilidad psiquiátrica, los diagnósticos más frecuentes en los hombres son el trastorno de personalidad y el abuso o dependencia de cocaína, mientras que los diagnósticos más prevalentes en la mujer son los trastornos afectivos, más específicamente el trastorno depresivo (Ávila Escribano, 2007).

1.2. La adicción al alcohol

La adicción a sustancias es un trastorno crónico y recidivante caracterizado por la pérdida del control sobre el uso de una sustancia y que facilita por la interacción entre factores ambientales, genéticos y neurobiológicos (Volkow & Li, 2004). El proceso de adicción comienza con un consumo ocasional que produce un refuerzo positivo de forma aguda que puede producir cambios en el patrón de consumo y convertirlo en compulsivo, iniciando un proceso de dependencia a la sustancia.

Con respecto a las teorías más relevantes sobre la adicción, se va a realizar un breve repaso de la hipótesis de la automedicación, de los procesos oponentes, la desregulación de la homeostasis emocional y de la sensibilización del incentivo. Se sabe que son muchas y distintas las causas que llevan a desarrollar una drogodependencia y que ninguna causa deriva por sí sola en un proceso adictivo, ya que, como hemos indicado, es un proceso multivariable:

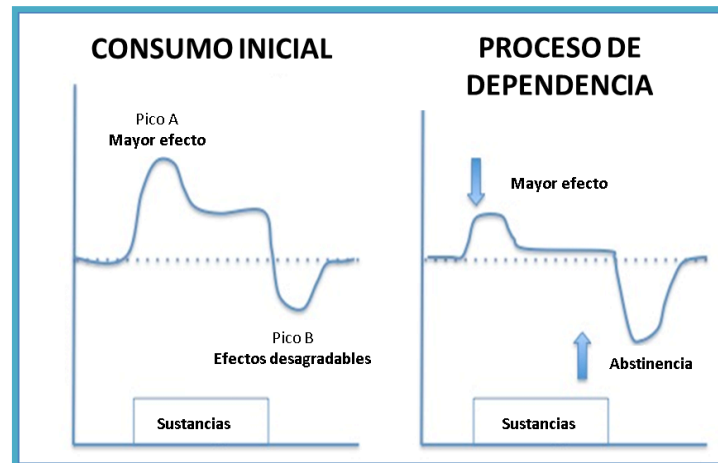
Las teorías más antiguas se basaban en que una personalidad determinada predispone a la adicción. Alineada con esta teoría, la **hipótesis de la automedicación** (Khantzian, 1997) busca explicar el rol de las sustancias en la solución de problemas crónicos en la persona en cuatro áreas de su funcionamiento: la vida afectiva, autoestima, relaciones y autocuidado. Los déficit en todas ellas o alguna de estas áreas llevan a explicar la vulnerabilidad ante el efecto específico de las sustancias, que en el caso del alcohol, funcionaría ofreciendo un alivio farmacológico rápido frente a emociones extremadamente intensas y afectivamente negativas.

La **teoría de los procesos oponentes** (Solomon & Corbit, 1974) parte de la base de que el cerebro contiene diferentes mecanismos capaces de equilibrar cualquier estado afectivo que se aleje de la estabilidad, ya sea placentero o aversivo (ver Figura 2). Una droga de abuso induciría al ser consumida un estado emocional/afectivo positivo que el organismo contrarrestaría con una contrarrespuesta de valencia hedónica respuesta. La repetición de ese proceso podría llevar a una desregulación emocional como describe la siguiente teoría.

La **teoría de la desregulación de la homeostasis emocional** (Koob et al, 2004) parte de la teoría de Solomon y describe cómo la exposición repetida a una droga de abuso magnifica la contra respuesta emocional de valencia hedónica negativa, llevando a una espiral en la que se produce una desregulación del sistema de recompensa cerebral, que explicaría la emergencia de un afecto negativo que impregnaría los procesos afectivos asociados al proceso adictivo.

Los componentes del proceso adictivo serían: la preocupación por conseguir la droga, el efecto agudo de la droga y la abstinencia asociada a un estado emocional negativo. El estado de preocupación y la anticipación a sus efectos se relacionan con el efecto de sensibilización psicomotora que facilitaría la búsqueda y consumo para aliviar ese estado afectivo emergente.

Figura 2: Mecanismo de los procesos oponentes



En la primera figura, tras el consumo de una sustancia se activa el proceso A (proceso emocional relacionado con la intensidad y duración del estímulo reforzante), y posteriormente como consecuencia, se dispara el proceso opuesto B (de naturaleza fisiológica y desagradable) hasta volver al estado basal. En la segunda figura, cuando la dependencia está instaurada, el pico A es menos intenso y duradero en el tiempo, sin embargo se incrementan los efectos desagradables de la abstinencia. Adaptado de Solomon & Corbit (1974).

La teoría de la **sensibilización del incentivo** (Robinson & Berridge, 1993) propone que la administración repetida a las drogas de abuso provoca un aumento progresivo y duradero no sólo de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, sino del valor hedónico asociado al contexto donde se produce el consumo. Los efectos psicomotores de las drogas se solapan con los sustratos neuronales del sistema mesolímbico, especialmente las proyecciones dopaminérgicas del Área tegmental ventral (ATV) hacia el Núcleo Accumbens (NAc) y sus conexiones mutuas con la amígdala, por las cuales el contexto adquiere propiedades reforzadoras que facilitaran la recaída contextual.

La teoría de la **pérdida del control sobre el uso** (Everitt & Robbins, 2016) se basa en que la adicción al final del proceso no es sino una pérdida del control voluntario sobre el acto volitivo del consumo de reforzadores. La conducta se convierte primero en un hábito y después en una compulsión que escapa al control consciente de la corteza prefrontal/orbitofrontal. Por lo tanto, se origina en circuitos subcorticales estriatales alimentados por la información contextual sensibilizada y la información afectiva negativa producida por la desregulación homeostática anteriormente descritas.

Los conocimientos acerca de la etiología de la fármaco-dependencia se van desarrollando desde diferentes puntos de vista y las variables más conocidas que podemos relacionar, directa o indirectamente, con la adicción al alcohol son las siguientes:

Aspectos culturales y sociales

- El proceso de urbanización masivo del campo a la ciudad produjo un desarraigo y problemática económica y social que se percibe sobre todo en las grandes urbes.
- El uso de sustancias para aliviar cualquier dolor y la existencia de medicamentos que genera poca tolerancia al sufrimiento.
- Los cambios en la estructura familiar, la incorporación de la mujer al mundo laboral y la desaparición de figura de referencia en el hogar.
- El estilo educativo autoritario o permisivo.

Factores genéticos

Son aquellos que predisponen a la dependencia de ciertas sustancias frente a los componentes ambientales. La bibliografía describe que un 49% de los dependientes al alcohol son de tipo genético. El tipo de paciente característico tiene una edad de inicio del trastorno antes de los 25 años, caracterizado por una ingesta elevada persistente, conductas agresivas, antisociales y delictivas. Este perfil de pacientes, es distinto del perfil de los denominados de tipo ambiental, que tienen un comienzo más tardío, tienen altibajos en la frecuencia de consumo y una pérdida progresiva sobre el control de la sustancia en el tiempo. Este segundo tipo suele cursar con muchos sentimientos de culpa después de los periodos de ingesta de alcohol.

La heredabilidad de los TUA se sitúa en torno al 35-60% con una proporción de concordancia en monocigóticos frente a concordancia en dicigóticos de 2 a 1 (Kendler, 2003). El riesgo de heredabilidad se multiplica por dos en los familiares de pacientes con dependencia al alcohol frente a los controles y la edad de consumo de alcohol se adelanta (Liu et al, 2004); además este perfil de pacientes tienen mayor riesgo de tener trastornos de abuso a otras sustancias o de presentar trastornos comórbidos de ansiedad, depresión o trastorno antisocial de la personalidad (Nurnberger, 2004).

Factores individuales

Las teorías sobre distintos fenotipos de pacientes dependientes difieren según el autor aunque todos coinciden en que hay dos tipos fundamentales. Uno de los fenotipos está caracterizado por un inicio tardío en los problemas derivados del consumo de alcohol, menor cantidad de criterios de dependencia lo que indica menor gravedad y problemática asociada. El segundo fenotipo está caracterizado por un inicio en el trastorno temprano, con antecedentes familiares de psicopatología, dependencia alcohólica grave con mayor cantidad de criterios de dependencia y problemática asociada (Pombo & Lesch, 2009).

Jellinek y Bowman (Jellinek, 1961) establecieron cuatro subtipos de pacientes dependientes: primario (con un inicio precoz y rápido de la psicopatología alcohólica), secundario a otro trastorno psiquiátrico, de tipo intermitente y por último un tipo ligado a causas externas.

Para Cloninger y colaboradores, el tipo I serían aquellos pacientes menos graves con menor carga familiar, con un inicio tardío, que afecta a ambos sexos por igual en el que influyen tanto factores ambientales como genéticos; el tipo II serían los pacientes más graves y con mayor carga familiar, y de tipo genético (con poca influencia ambiental), ya que afecta principalmente a hijos varones de dependientes de alcohol (Cloninger et al., 1981).

Lesch distingue cuatro tipos de pacientes: El tipo I acompañado de *craving* y síntomas tempranos de abstinencia y vulnerabilidad endorrfínica. El tipo II va asociado a la ideación suicida, ansiedad, conflictos premórbidos y vulnerabilidad serotoninérgica. El tipo III va asociado a conductas agresivas e impulsivas, con comorbilidad psiquiátrica. Por último, el tipo IV serían aquellos con daño cerebral premórbido, con deterioro social, orgánico y psíquico (Lesch, 1988).

Babor y colaboradores distinguen entre el tipo A y el tipo B. El tipo A serían los pacientes menos graves, de inicio tardío y sin carga familiar. El tipo B serían los más graves, de inicio precoz, con psicopatología comórbida, trastornos de conducta y mayor carga familiar (Babor et al., 1992).

El equipo de Cardoso clasifica cinco tipos de pacientes: El *tipo ansiopático*, cuya característica fundamental es el funcionamiento típicamente ansioso. El *tipo heredopático*, que congrega aquellos pacientes con influencias genéticas y factores familiares de riesgo. El tipo *timopático* relacionado con sintomatología afectiva. El *tipo sociopático* relacionado con trastornos de conducta del tipo disruptivos bajo la influencia del alcohol, y el *tipo adictopático* formado por individuos jóvenes poli consumidores de alcohol y otras sustancias psicoactivas (Cardoso et al., 2006).

Hesselbrocks propone una clasificación de cuatro fenotipos alcohólicos debido a un análisis de clases latentes que engloba mejor a los distintos tipos de pacientes: El primer tipo es el severo/crónico, es el paciente caracterizado por tener un tipo de abuso medio o severo que responden ante la influencia ambiental y con escasos problemas sociales causados por el alcohol. El segundo tipo, es el afectivo-ansioso caracterizado por estar asociado con un historial familiar de alcoholismo, con un inicio temprano y problemas relacionados con el consumo de alcohol y con elevadas tasas de síntomas depresivos y ansiosos. El tercer tipo, es el tipo de pacientes con problemática leve. El último y cuarto tipo es el antisocial con grandes problemas de conducta (Hesselbrocks, 2006).

1.2.1. Trastornos por uso de alcohol

El alcohol es psicoactivo y una sustancia de abuso que comparte propiedades con los sedantes, hipnóticos y ansiolíticos. La definición de sustancia de abuso es “cualquier sustancia, tomada a través de cualquier vía de administración, que altera el estado de ánimo, el nivel de percepción o el funcionamiento cerebral” (Schuckit & Smith, 2000). Según el manual of mental disorders 4th edition text revision (DSM-IV-TR) (APA, 2000) los diagnósticos de trastornos por uso de sustancias (TUS) se aplican a todas aquellas sustancias que introducidas en el organismo, afectan o alteran el estado de ánimo y la conducta, que acarreen

trastornos incapacitantes para el consumidor en la esfera personal, laboral, social, física y familiar, así como síntomas y estados característicos como intoxicación, tolerancia, abuso, dependencia y síndrome de abstinencia.

Las personas que no han desarrollado TUA, son capaces de moderar sus deseos frente a éste, lo que no ocurre con las personas con dependencia a esta sustancia. Estas personas sufren durante años una necesidad persistente o ansia llamada “*craving*”, caracterizado por problemas cognitivos, un modo de vida estresante alternado con periodos de abstinencia (Sinha et al., 2009).

El presente trabajo se centra específicamente en aquellos problemas causados por consumo de alcohol. A continuación se describen los distintos tipos de problemas derivados de los diferentes patrones de consumo de alcohol:

- **Intoxicación por alcohol**

La característica esencial de la intoxicación por sustancias es la presencia de un cambio psicológico o comportamental desadaptativo clínicamente significativo. Se trata de un síndrome reversible específico debido a la ingestión reciente de la sustancia. Se caracteriza por cambios psicológicos o comportamentales desadaptativos debido al efecto de la sustancia sobre el sistema nervioso central (SNC) (irritabilidad labilidad emocional, deterioro cognoscitivo, deterioro de la capacidad de juicio, deterioro de la actividad laboral o social) que se presentan durante el consumo de la sustancia o poco tiempo después. Los síntomas no se deben a una enfermedad médica y no se explicarían mejor por la presencia de otro trastorno mental. A continuación, en la Tabla 2, se muestran los criterios DSM-IV-TR específicos para la intoxicación de alcohol.

Tabla 2: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para la intoxicación por alcohol

Criterios para la intoxicación de alcohol	
A.	Ingestión reciente de alcohol
B.	Cambios psicológicos o comportamentales desadaptativos clínicamente significativos (sexualidad inapropiada, comportamiento agresivo, labilidad emocional, deterioro de la capacidad de juicio y deterioro de la actividad laboral o social) que se presentan durante la intoxicación o pocos minutos después de la ingesta de alcohol
C.	Uno o más de los siguientes síntomas que aparecen durante o poco tiempo después del consumo de alcohol: (1) Lenguaje farfullante (2) Incordinación (3) Marcha inestable (4) Nistagmo (5) Deterioro de la atención o de la memoria (6) Estupor o coma
D.	Los síntomas no se deben a enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental

- **Abuso de alcohol**

El diagnóstico de abuso de alcohol se evalúa según los criterios generales de abuso de sustancias que se desarrolla en la Tabla 3.

Tabla 3: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para el abuso de sustancias

Criterios para el abuso de sustancias

A. Un patrón desadaptativo de consumo de sustancias que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por uno (o más) de los ítems siguientes durante un período de 12 meses:

- (1) consumo recurrente de sustancias, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa (p. ej., ausencias repetidas o rendimiento pobre relacionados con el consumo de sustancias: ausencias, suspensiones o expulsiones de la escuela relacionadas con la sustancia; descuido de los niños o de las obligaciones de la casa)
- (2) consumo recurrente de la sustancia en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (p. ej., conducir un automóvil o accionar una máquina bajo los efectos de la sustancia)
- (3) problemas legales repetidos relacionados con la sustancia (p. ej., arrestos por comportamiento escandaloso debido a la sustancia)
- (4) consumo continuado de la sustancia, a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia (p. ej., discusiones con la esposa acerca de las consecuencias de la intoxicación, o violencia física)

El abuso de alcohol se da cuando hay uso continuado de la sustancia, que conlleva a un deterioro o malestar clínicamente significativo. A pesar de las consecuencias negativas derivadas del mismo, el rendimiento social, laboral y la actividad escolar se suelen ver afectados por los efectos de la intoxicación. El sujeto puede beber en situaciones peligrosas y pueden tener comportamientos que les causen problemas legales o detenciones. Los sujetos con abuso de alcohol pueden continuar bebiendo a pesar de que saben los problemas sociales o interpersonales que ello les acarrea.

Es importante resaltar que cuando estos problemas causados por el alcohol se acompañan con demostraciones de tolerancia, abstinencia o comportamientos compulsivos relacionados con la bebida, debe considerarse el diagnóstico de dependencia en vez del de abuso de alcohol.

- **Dependencia de alcohol**

El diagnóstico de abuso de alcohol se evalúa según los criterios de abuso de sustancias que se desarrolla en la Tabla 4. La dependencia se desarrolla por el uso excesivo de la sustancia, que genera consecuencias negativas significativas a lo largo de un amplio período de tiempo, aunque también puede ocurrir que se produzca por un uso continuado intermitente o alto consumo sólo los fines de semana.

Debido a que la abstinencia del alcohol es desagradable e intensa, los sujetos con dependencia del alcohol pueden continuar consumiendo alcohol, a pesar de las consecuencias adversas, para evitar o aliviar los síntomas de abstinencia. Una relativa minoría de los sujetos nunca experimenta síntomas relevantes de abstinencia y sólo cerca del 5% de los sujetos con dependencia los experimenta siempre.

Una vez presente el patrón de uso compulsivo, los sujetos con dependencia pueden dedicar mucho tiempo al consumo de bebidas alcohólicas y continúan con frecuencia el consumo de alcohol a pesar de la demostración de las consecuencias adversas físicas y psicológicas.

Es probable que el primer episodio de intoxicación alcohólica aparezca en la juventud, y la edad de inicio de los trastornos comienza entre los 20 y los 30. La primera demostración de abstinencia no aparece hasta que se han desarrollado muchos otros aspectos de la dependencia alcohólica. El curso de la dependencia es variable y se caracteriza por episodios de intermitencia con periodos de remisión y recaídas. Los estudios de seguimiento de los sujetos con una actividad normalizada muestran una proporción de 1 año de abstinencia en más de 65% de los casos en tratamiento. Solo un 20% los dependientes al alcohol mantienen una abstinencia prolongada sin ningún tratamiento.

- **Abstinencia de alcohol**

La abstinencia representa la hiperactividad no compensada por efecto del alcohol. Los síntomas de abstinencia se alivian con frecuencia tras la administración de alcohol u otros depresores del SNC. Se trata de la presencia de un síndrome específico de una sustancia debido al cese o reducción de su consumo prolongado y en grandes cantidades causando malestar clínicamente significativo o un deterioro en la actividad laboral y social o en otras áreas importantes de la actividad del individuo. Los síntomas producidos por la abstinencia al alcohol son los siguientes: hiperactividad autonómica (sudoración o más de 100 pulsaciones), temblor distal en las manos, insomnio, náuseas o vómitos, agitación psicomotora, ansiedad, crisis comiciales e ilusiones o alucinaciones visuales, táctiles o auditivas transitorias. Los síntomas empiezan cuando las concentraciones de alcohol en sangre disminuyen bruscamente (entre 4 y 12 horas) después de haber interrumpido o reducido la bebida aunque también pueden aparecer tras largos periodos de tiempo. Puesto que la vida media del alcohol es corta, los síntomas de abstinencia alcanzan su mayor intensidad durante el segundo día, mejorando de forma marcada a partir del cuarto o quinto día.

Los síntomas de ansiedad, insomnio y disfunción anatómica pueden continuar en distintos grados de intensidad durante periodos de 3 a 6 meses. Menos del 5% de los sujetos presenta síntomas de abstinencia más graves. Las crisis comiciales aparecen en menos del 3% de los sujetos. El delirium por abstinencia de alcohol incluye alteraciones cognoscitivas y de la conciencia, también alucinaciones visuales, táctiles o auditivas "delirium tremens". Los criterios diagnósticos específicos para la abstinencia de alcohol se recogen en la Tabla 5.

Tabla 4: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para la dependencia de sustancias

Criterios para la dependencia de sustancias

Un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

(1) tolerancia, definida por cualquiera de los siguiente ítems:

(a) una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado

(b) el efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con su consumo continuado

(2) abstinencia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

(a) el síndrome de abstinencia característico para la sustancia (v. Criterios A y B de los criterios diagnósticos para la abstinencia de sustancias específicas)

(b) se toma la misma sustancia (o una muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

(3) la sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un periodo más largo de lo que inicialmente se pretendía

(4) existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de sustancia

(5) se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia (p. ej., visitar a varios médicos o desplazarse largas distancias), en el consumo de la sustancia (p. ej., fumar un pitillo tras otro) o en la recuperación de los efectos de la sustancia

(6) reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia

(7) se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia (p. ej., consumo de la cocaína a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta de alcohol a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta d alcohol a pesar de que empeora una úlcera)

Codificación del curso de la dependencia en el quinto dígito:

0 Remisión total temprana

0 Remisión parcial temprana

0 Remisión total sostenida

0 Remisión parcial sostenida

2 En terapéutica con agonistas

1 En entorno controlado

4 Leve/moderado/grave

Especificar si:

Dependencia fisiológica: signos de tolerancia o abstinencia (si se cumplen cualquiera de los puntos 1 o 2)

Sin dependencia fisiológica: no hay signos de tolerancia o abstinencia (si no se cumplen los puntos 1 y 2)

Tabla 5: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para la abstinencia de alcohol

Criterios para la abstinencia de alcohol	
1.	Interrupción (o disminución) del consumo de alcohol después de su consumo prolongado y en grandes cantidades
2.	Dos o más de los siguientes síntomas desarrollados horas o días después de cumplirse el criterio A:
	(1) Hiperactividad autonómica (p. ej., sudoración o más de 100 pulsaciones)
	(2) Temblor distal de las manos
	(3) Insomnio
	(4) Náuseas o vómitos
	(5) Alucinaciones visuales, táctiles o auditivas transitorias, o ilusiones
	(6) Agitación psicomotora
	(7) Ansiedad
	(8) Crisis comiciales de gran mal (crisis epilépticas)
3.	Los síntomas del criterio B provocan un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad social laboral, o de otras áreas importantes de la actividad del sujeto.
4.	Los síntomas no se deben a enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental

La duración de la abstinencia tiene cierto paralelismo con la vida media de la sustancia: cuanto mayor es la duración de la acción, mayor es el tiempo entre el cese y el inicio de los síntomas de abstinencia y mayor es la probabilidad de duración de la abstinencia.

• **Otros trastornos inducidos por alcohol**

El alcohol produce una serie de efectos en todo el organismo, tanto a nivel físico como psicológico (ver Tabla 6). La dependencia al alcohol puede ir acompañada de enfermedades físicas asociadas, como la insuficiencia renal, neumonía, hemorragias digestivas, secuelas de traumatismos craneales, hipoglucemia y alteraciones del equilibrio electrolítico. La ingestión de dosis altas de alcohol afecta al tubo digestivo, al sistema cardiovascular y al sistema nervioso. La hipertensión moderada es una de las enfermedades asociadas que se da con más frecuencia, mientras que la miocardiopatía y otras miopatías son menos frecuentes.

Los efectos gastrointestinales incluyen gastritis y úlceras de estómago o duodeno, además cerca del 15% de los consumidores de alcohol presentan cirrosis hepática y pancreatitis. Se diferencian tres procesos histológicamente distintos en una hepatopatía: esteatosis, caracterizada por la acumulación de grasa del parénquima; hepatitis alcohólica, en la que la infiltración del parénquima por leucocitos neutrófilos se asocia con daño de hepatocitos; y la cirrosis, asociado con inflamación crónica y fibrosis. Las tres manifestaciones pueden estar presentes de forma independiente o en combinación. Aunque la hepatitis alcohólica se asocia frecuentemente con la cirrosis, puede presentarse como un síndrome clínico distinto que, en su forma más extrema, causa insuficiencia hepática y tiene un alto índice de mortalidad. La cirrosis del hígado surge en el 25% de los pacientes con TUA y el 75% de los casos de cirrosis hepática son el resultado de la ingesta de alcohol.

Tabla 6: Efectos del alcohol en distintos sistemas. Fuente: Adaptación ISEP (2013)

ÁMBITO FÍSICO	Sistema nervioso: Polineuritis (Parálisis/alteración muscular/anestesia/dolores/calambres) Encefalopatías: Wernicke-Korsakov Epilepsia Aparato digestivo: Hígado/tubo digestivo/páncreas Trastorno nutricional: Bajo apetito/problemas de absorción/déficit vitamínico (B1 polineuritis, B12 anemia, A visión nocturna) Bajo Mg, P, Ca, K... Sangre: Anemia/hematíes de pequeño tamaño/ descenso glóbulos blancos Sistema cardiovascular: Vasodilatación/atrofia corazón/ arritmias/ insuficiencia cardíaca Problemas musculares: Cansancio/dolores/debilidad Disfunción sexual
ÁMBITO PSICOLÓGICO	Afectación de las funciones superiores Alucinaciones Demencias Inadaptación social, laboral y personal Depresión Enfermedad de Korsakov

Existen además, otras complicaciones asociadas a nivel periférico, como la gastritis que cursa con trastornos como la dispepsia, náuseas e hinchazón. La hepatomegalia, varices esofágicas y hemorroides van asociadas a las alteraciones hepáticas. También aparecen otros signos físicos como el temblor, la marcha inestable, el insomnio y la disfunción eréctil. El consumo de alcohol durante el embarazo puede asociarse a abortos espontáneos y síndrome alcohólico fetal.

Los efectos más persistentes en el SNC incluyen déficit cognitivo, deterioro grave de memoria y cambios degenerativos en el cerebelo relacionados con la deficiencia de vitaminas (especialmente vitaminas B1 y B12). La intoxicación por alcohol se asocia en ocasiones con amnesia (lagunas o *blackouts*) relacionados con la presencia de niveles altos de alcoholemia y con la rapidez con la que se alcanzan dichos niveles. Los trastornos relacionados con el alcohol se asocian a un aumento significativo del riesgo de accidentes, violencia y suicidio.

- **Fenómenos *craving* y *priming***

Por *craving* entendemos el deseo urgente de experimentar los efectos de una sustancia psicoactiva que ha sido probada previamente. Se describe como el componente subjetivo, motivacional y prospectivo que lleva a la incapacidad del sujeto para mantenerse en abstinencia (López & Becoña, 2006).

Es una motivación intensa, una necesidad imperiosa ante la conducta adictiva (Tiffany & Conklin, 2000) cuyo fin es en el alivio de los síntomas de abstinencia.

Los modelos animales que estudian los episodios de recaída al alcohol, han demostrado que el comportamiento de búsqueda puede ser activado por señales asociadas con el consumo de sustancias y por estrés. El *craving* se considera un fenómeno implicado de forma generalizada en las recaídas y la continuidad del consumo, que aparece tras largos periodos de abstinencia durante el tratamiento (Blasco et al., 2008). La evidencia sugiere que estos estímulos inducen a la recaída, al menos en parte, por su habilidad de activar el sistema mesolímbicodopaminérgico.

Nos referimos a *priming* como un efecto relacionado con la memoria implícita a nivel perceptivo, se produce un fenómeno de pérdida de control ante la sustancia. La pérdida de control aparece tras la ingesta y se incrementa con los primeros consumos. Este constructo aparece en pacientes con patrones de consumo no diarios, más bien esporádicos, en donde se produce una tolerancia más lenta y un mantenimiento más duradero de los efectos reforzantes (Lewis & June, 1990). Tanto el *craving* como el *priming* son efectos que se producen también en trastornos de la conducta adictiva no tóxica, como el juego patológico.

Los fenómenos de sensibilización (tolerancia), *craving* y *priming*, se deben a la disfunción de estructuras límbicas, dentro del sistema de la amígdala ampliada. Estos fenómenos producen mayor impulsividad y deterioro del autocontrol conductual, con déficit en estructuras del sistema frontoestriatal como trasfondo neurobiológico, que se manifiesta con una inhibición de respuestas conductuales apropiadas (Guardia et al., 2011).

1.2.2. Neurobiología de los trastornos por uso de alcohol.

1.2.2.1. Sistema cerebral de recompensa

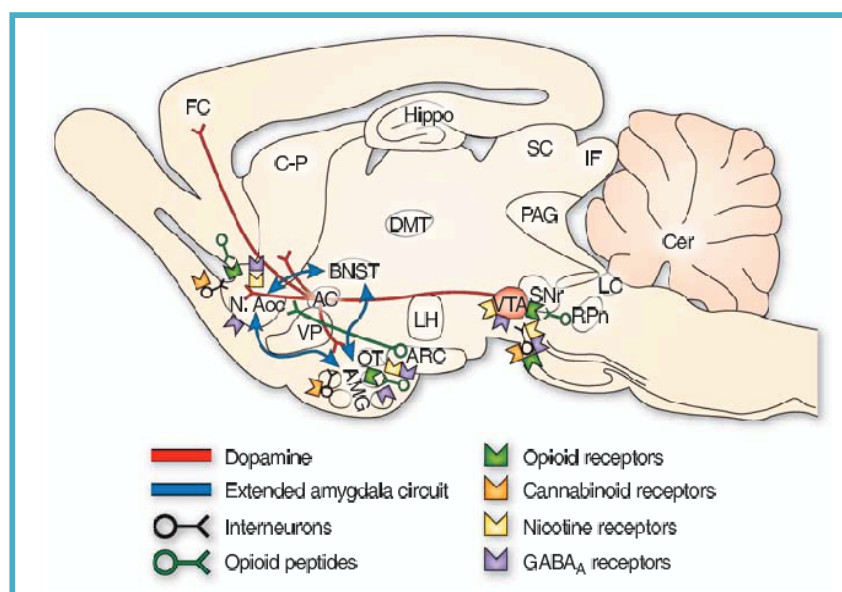
El alcohol presenta una capacidad adictiva elevada que se relaciona con cambios en los sistemas de refuerzo cerebral. La administración de alcohol activa los circuitos implicados en la génesis y mantenimiento de conductas de recompensa en el aprendizaje condicionado (Greenspan et al., 1997).

El sistema de recompensa cerebral está situado en el haz prosencefálico medial y depende en gran medida de la activación de neuronas dopaminérgicas del ATV que se proyectan a estructuras límbicas y frontales. La corteza del NAc (*shell*) actúa como un detector de señales relevantes conductuales y refuerza consecuencias motoras intencionales en el núcleo (*core*) y está regulada a su vez por la corteza prefrontal. El hipocampo y la amígdala son los responsables de los procesos de condicionamiento ambiental y contextual del consumo y están conectadas con el estriado ventral para ejercer el control de las acciones y sus consecuencias. A continuación se describen las funciones de otras áreas del sistema de recompensa cerebral:

- Las estructuras motoras como el estriado dorsal (caudado-putamen) son los encargados de la formación de hábitos y el establecimiento de conductas compulsivas.
- Las vías meso-corticales que llegan a la corteza frontal y la vía dopaminérgica nigro-estriatal que va al caudado-putamen, participan conjuntamente en la sensibilización al estrés, un aspecto fundamental en los modelos de adicción a psicoestimulantes.
- Las conexiones descendentes que pasan a través de la sustancia gris periacueductal median aspectos aversivos.
- Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (núcleo basal de Meynert) son responsables de conductas de búsqueda.
- El núcleo tegmental pedúnculo pontino actúa de interfase entre los ganglios basales y las eferencias motivacionales incentivadas del sistema accumbens-pálido, para la adquisición de las conductas reforzadas.
- El *locus coeruleus*, que contiene neuronas noradrenérgicas, media en el síndrome de abstinencia y en las respuestas de estrés aversivas en la amígdala.

En la Figura 3 se representan los distintos circuitos neuroquímicos cerebrales y receptores principales en el sistema de recompensa cerebral. El NAc libera dopamina ante la presencia de estímulos relevantes, en este caso la ingesta de alcohol. Las neuronas dopaminérgicas también se activan en respuesta a los estímulos reforzadores primarios (comida, agua, sexo) necesarios para la supervivencia del individuo y de la especie, teniendo un papel decisivo en el aprendizaje motivacional, tanto de conductas apetitivas de aproximación como de conductas consumatorias relacionadas con estímulos naturales, produciendo saciedad y autolimitación. Los circuitos de recompensa no son exclusivamente dopaminérgicos, también se modulan por otros sistemas neurales mediante otros neurotransmisores y tienen importancia en el establecimiento del tono hedónico (Greenspan et al., 1997). Dentro de estos sistemas no dopaminérgicos destacamos el sistema opioide y el sistema serotoninérgico, la facilitación de la actividad inhibitoria del ácido gamma-aminobutírico (GABA), una reducción de la actividad excitatoria del glutamato, la noradrenalina y de los canales de calcio activados por voltaje.

Figura 3: Circuitos neuroquímicos en los sistemas de recompensa cerebral en TUA



Vía roja: el alcohol facilita la liberación de la dopamina en el NAc a través de una acción del VTA. Los endocannabinoides y adenosina pueden interactuar con elementos postsinápticos en el NAc implicando al sistema dopaminérgico y/o a sistemas opioides. **Flechas en azul:** representan interacciones dentro del sistema extendido de la amígdala por su papel importante en el refuerzo del alcohol; AC: comisura anterior; AMG: amígdala; ARC: núcleo arqueado; BNST: núcleos de la estría terminal; Cer: cerebelo; C-P: caudado-putamen; DMT: tálamo dorsomedial; FC: cortex frontal; Hippo: hipocampo; IF: colículo inferior; LC: locus coeruleus; LH: hipotálamo lateral; NAcc: núcleo accumbens; OT: tracto olfatorio; PAG: gris periacueductal; RPh: núcleo reticular pontino; SC: colículo superior; SNr: sustancia negra reticular; VP: pálido ventral; VTA: área tegmental ventral.

Fuente: Koob & Volkow, 2010

El factor liberador de corticotropina (CRF) es un péptido localizado en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y en el sistema límbico, especialmente en el núcleo central de la amígdala. El CRF controla las respuestas fisiológicas, endocrinas y comportamentales ante agentes estresantes como son los efectos asociados a la abstinencia de alcohol (Olive et al., 2003). De hecho, durante la abstinencia alcohólica se produce una masiva liberación de CRF en el núcleo central de la amígdala, coincidente con la máxima gravedad sintomática del síndrome de abstinencia a alcohol (Merlo-Pich et al., 1995), algo observado también en otras drogas de abuso (Rodríguez de Fonseca et al., 1997).

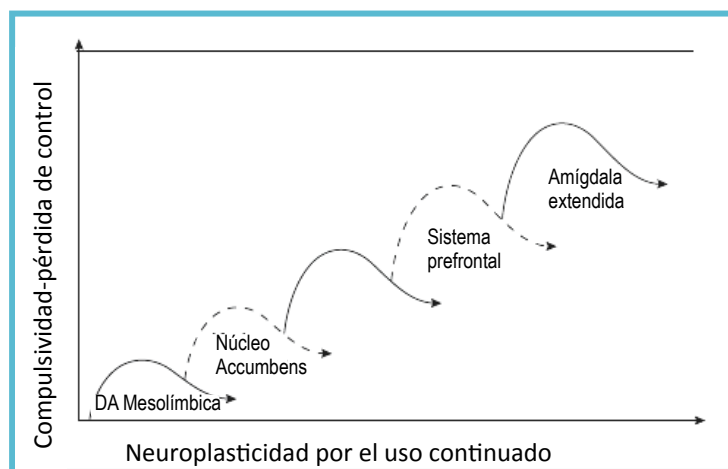
El neuropéptido Y (NPY) es un péptido de 36 aminoácidos distribuido en el SNC con altas concentraciones en la amígdala extendida (Adrian et al., 1983). Actúa como neurotransmisor y neuromodulador en el control de la ingesta de alimentos y en la integración de comportamientos emocionales. Se ha sugerido su participación tanto en las respuestas neurobiológicas como en la regulación del consumo de alcohol (Caberlotto et al., 2001; Thiele, et al., 1998) porque su administración reduce el comportamiento ansioso (Kask et al., 1998).

El CRF ejerce una acción ansiogénica (Moreau et al., 1997) y el NPY presenta propiedades ansiolíticas (Heilig & Murison, 1987) por lo que la interacción entre ambos sistemas regula el estrés, la ansiedad y la depresión.

1.2.2.2. Cambios neurobiológicos en el proceso de la adicción

La adicción es un proceso y conlleva una serie de cambios funcionales que alteran el equilibrio homeostático en los circuitos cerebrales de los sistemas de refuerzo (Figura 4), en función de factores como el tiempo de consumo y el patrón de ingesta de la bebida.

Figura 4: Neuroplasticidad cerebral en el proceso de pérdida de control sobre la sustancia

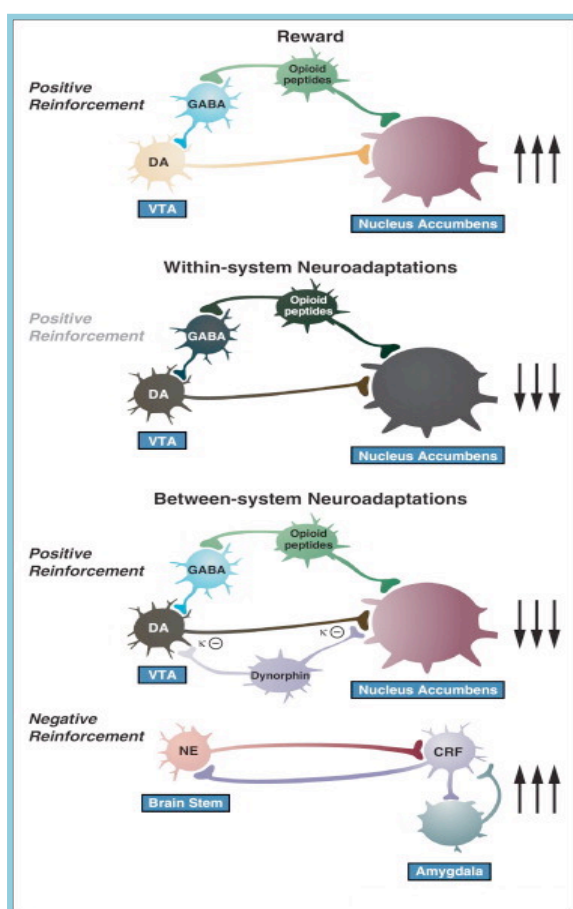


La neuroplasticidad afecta a distintos circuitos cerebrales. El aumento de consumo de sustancias incrementa comportamientos compulsivos y la pérdida de control sobre la sustancia. DA: Dopamina

Fuente: Koob & Volkow, 2010

Los cambios que se producen a nivel neuroquímico se pueden agrupar en tres: los cambios que se producen en la primera fase de consumo que se caracteriza por los efectos reforzantes y ansiolíticos del alcohol, la segunda fase donde se produce la tolerancia a la sustancia y la tercera fase en la que se desarrolla la dependencia con cambios significativos que se revierten en la abstinencia, están representados gráficamente en la Figura 5.

Figura 5: Cambios en el circuito de adicción



En la figura se representan los cambios que se dan en el circuito de recompensa cerebral. En la figura de arriba, aparece la gran contribución de dopamina mesolímbica y de péptidos opioides que convergen en el NAc. En la figura del medio se representan neuroadaptaciones en la etapa de abstinencia que debido a la excesiva activación del sistema de refuerzo: la activación de AMPc, regulación a la baja de receptores de dopamina D₂ y disminución de los disparos de neuronas dopaminérgicas al VTA. En la figura de abajo, aparecen dos neuroadaptaciones importantes asociadas al progreso de la dependencia y los efectos negativos: la activación de la dinorfina que disminuye la actividad dopaminérgica y el reclutamiento de CRF en la amígdala extendida. El sistema de estrés cerebral en la corteza prefrontal aumenta las neuroadaptaciones mientras contribuye al mantenimiento de los refuerzos negativos en el ciclo adictivo.

Fuente: Koob, 2013

Refuerzo agudo y efectos ansiolíticos del alcohol

Son varios los sistemas neuroquímicos que están involucrados en los efectos agudos del alcohol en el organismo:

El sistema dopaminérgico está relacionado con los efectos positivos que produce el alcohol a corto plazo. La liberación de dopamina refuerza conductas y estímulos ambientales relacionados con el consumo (Robinson & Berridge, 1993) mediante la estimulación de los receptores dopaminérgicos D₂, aumentando los niveles extracelulares de dopamina en el NAc (Weiss et al., 1993). Con la administración creciente de alcohol se producen neuroadaptaciones crónicas en las vías de señalización de los receptores de dopamina y de serotonina en el NAc. Además, el GABA también está implicado en esta primera fase, es el responsable del estado de sedación producido por el alcohol (Martz et al., 1983). El GABA actúa sobre el receptor GABA_A, en la corteza cerebral y en la médula espinal.

El sistema endógeno opioide también tiene un importante papel en los efectos reforzadores del alcohol (Herz, 1997). Este sistema está muy presente en la práctica clínica, por el uso de naltrexona y nalmefene (antagonistas opioide) en la prevención de recaídas en los tratamientos de TUA o en la reducción del consumo (Jarosz et al., 2013; Nutt, 2014; Palpacuer et al., 2015).

Tolerancia al alcohol

La administración repetida de alcohol conduce a cambios adaptativos en los sistemas de neurotransmisión y desarrollo de la tolerancia a la sustancia. En esta fase, se produce una disminución en la intensidad de los efectos, lo que hace que se necesite un aumento dosis de alcohol para alcanzar los efectos deseados de la sustancia.

Los mecanismos neurobiológicos implicados en la tolerancia al alcohol producen un aumento del metabolismo oxidativo y cambios neuroadaptativos en la composición de la membrana lipídica. Entre los sustratos implicados están la serotonina, el glutamato y la vasopresina. La exposición aguda al alcohol, inhibe la actividad del ácido glutámico, que actúa sobre receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y en receptores no NMDA como el kainato. El receptor NMDA es uno de los principales receptores de glutamato, está acoplado a un canal catiónico, que al activarse despolariza la neurona y aumenta la permeabilidad de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. La activación NMDA es responsable de los fenómenos de potenciación a largo plazo de procesos de aprendizaje y memoria. El bloqueo de esta actividad y sus conexiones en el septum y en el hipocampo juegan un rol esencial en el desarrollo de la tolerancia al alcohol (Kalat, 1998).

Abstinencia y dependencia al alcohol

En la abstinencia al alcohol, se produce una la disminución de la funcionalidad y desregulación de los neurotransmisores implicados en el refuerzo (sistemas GABAérgico, opioide, dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico). La función dopaminérgica se ve comprometida en la abstinencia aguda mediada por el sistema opioide. Además, como el alcohol es un potente modulador del estrés, la desregularización del sistema hipotalámico-hipofisiario adrenal (HHA) es clave desde un punto de vista motivacional durante del desarrollo de la dependencia al alcohol y las recaídas. El alcohol administrado de forma aguda y crónica activa el eje HHA y aumenta la liberación de CRF en el hipotálamo activando respuestas de estrés (Rivier et al., 1987; Rasmussen et al., 2000). Se han visto niveles extracelulares de CRF aumentados en la amígdala y en las terminaciones del núcleo estriado en los cuadros abstinencia al alcohol (Merlo-Pich et al., 1995).

Además hay un incremento de la actividad simpática debido a un aumento en la liberación de noradrenalina en el *locus coeruleus* que se manifiesta en hiperactividad como taquicardias, hipertensión, sudoración y temblor (Altman et al., 1996; Ayesta, 1991). En el giro dentado hipocampal, el consumo prolongado de alcohol produce la muerte de neuronas GABA y disminuye la expresión del receptor GABA_A en hipocampo y ATV. Además se potencia la actividad excitatoria glutamatérgica en la amígdala dando lugar a hiperexcitabilidad. Y se producen cambios en protein-quinasas A y C y en el AMPc (Suwaki et al., 2001).

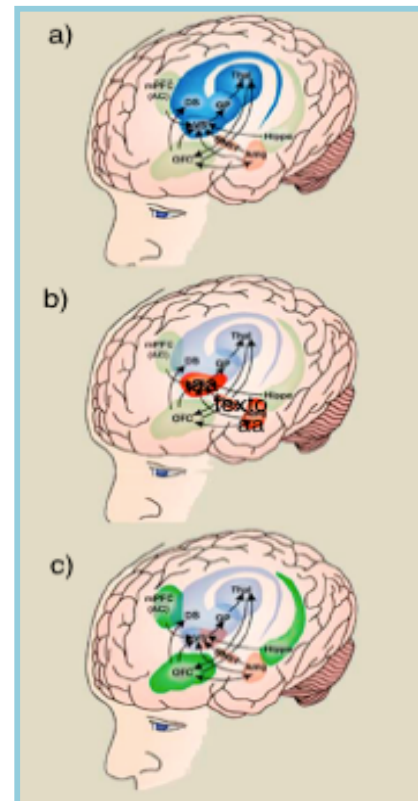
Por lo tanto, se producen cambios neuroplásticos en las distintas fases de la adicción. En las primeras etapas del consumo de alcohol el refuerzo positivo es inmediato (se producen los efectos eufóricos de la sustancia) y los cambios cerebrales debidos al aumento del consumo dan paso a comportamientos

mediados por refuerzo negativo (evitación de los síntomas desagradables de la abstinencia) con comportamientos compulsivos y de pérdida de control (Koob & Volkow, 2010).

Estos autores (Koob & Volkow, 2010) describen las tres etapas implicadas en la adicción y los sistemas neurales implicados en cada una (Figura 6):

- a) La etapa de *binge* o de intoxicación en la que se muestran los efectos reforzantes de los neurotransmisores a través de mecanismos en el NAc debido a las asociaciones estímulo-respuesta en el estriado dorsal.
- b) La etapa de la abstinencia de los efectos negativos se activa la amígdala extendida
- c) La etapa de preocupación y anticipación muestra el procesamiento de las respuestas condicionadas en la amígdala y la información contextual en el hipocampo. El control ejecutivo depende de la corteza prefrontal.

Figura 6: Sistemas cerebrales implicados en la adicción. Koob & Volkow, 2010.



1.3. Comorbilidad psiquiátrica en los trastornos por uso de alcohol

La comorbilidad psiquiátrica es la concurrencia en un mismo individuo de un TUA y un trastorno psiquiátrico. Además, existe una relación etiológica que subyace a esta comorbilidad, que aunque no esté clara la relación, se reconoce la intervención de factores genéticos, neurobiológicos y medioambientales causales en el desarrollo de estos trastornos. Existen tres hipótesis que intentan explicar la comorbilidad psiquiátrica:

- La existencia de dos o más factores interdependientes entre sí, cada uno de ellos tiene cursos clínicos diferentes y tratamientos independientes. Esta concurrencia puede explicarse por:
 - Modelo de la independencia biológica en la que ambos factores son independientes.

- Modelo del factor común en la que ambos trastornos son consecuencia de los mismos factores predisponentes (estrés, factores ambientales o influencias genéticas).
- El TUS es el primario: el primer trastorno influye en el desarrollo del segundo y, una vez instaurado el segundo, se desarrolla con curso independiente. Ambas condiciones deben ser tratadas durante todo el tiempo que sea necesario.
- El trastorno psiquiátrico es el primario: el segundo trastorno aparece para mitigar los problemas asociados al primero. Mediante la resolución del primero, el segundo trastorno (TUS) desaparece.

Los pacientes con TUA y comorbilidad psiquiátrica tienen mayor facilidad para recaer en el consumo, una mayor resistencia a los tratamientos en ambos trastornos y un peor pronóstico. Los estudios epidemiológicos muestran una alta concurrencia en la misma persona de trastornos mentales y de consumo de alcohol. Estos trastornos a menudo comienzan en la adolescencia, periodo en el que el cerebro experimenta cambios en su desarrollo. La exposición temprana a las sustancias incrementa el riesgo de sufrir trastornos mentales. Los estudios más amplios en este campo se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7: Prevalencias de comorbilidad psiquiátrica en distintos estudios en población con TUA. Adaptado de Vega Astudillo, 2015

Prevalencia de Trastornos Mentales en población con trastornos por uso de alcohol		Prevalencias (%)	Odds Ratio (OR)
Estudio ECA. 1990 (<i>Epidemiologic Catchment Area</i>)	T. Estado Ánimo	13,4%	1,9
	T. Ansiedad	19,4%	1,5
	Esquizofrenia	3,8%	3,3
	T. Antisocial	14,3%	21,0
	Otros Trastornos	36,6%	2,3
Estudio NCS. 1997-2005 (<i>National Comorbidity Survey</i>)	T. Estado Ánimo	29,2%	3,6
	T. Ansiedad	36,9%	2,6
Estudio NESARC. 2004 (<i>National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions</i>)	T. Estado Ánimo	-	4,1
	T. Ansiedad	-	2,6
	T. Personalidad	-	4,0

La adicción al alcohol y los trastornos psiquiátricos comparten algunos mecanismos neurobiológicos, que quedan recogidos en la Tabla 8.

Tabla 8: Mecanismos neurobiológicos implicados en los TUA y en los trastornos psiquiátricos

Mecanismos neurobiológicos en los TUA y en los trastornos psiquiátricos	
Sistemas primarios de neurotransmisión implicados	CRF Serotoninérgico Hipotálamo/extrahipotálamo Glutamatérgico Dopaminérgico Actividad de la MAO
Efectos en regiones cerebrales primarias	Actividad en circuitos frontal-límbico Actividad en cíngulo anterior Actividad amígdala Niveles de MAO-A y MAO-B

MAO: Monoaminooxidasa

1.3.1. Trastornos del estado de ánimo

Los trastornos del estado de ánimo son un conjunto de trastornos cuya principal característica subyacente es una alteración del estado de ánimo del individuo. Suelen diferenciarse dos grupos de trastornos del estado de ánimo en función de si incluyen o no la presencia de episodios de **manía o hipomanía**, los **trastornos depresivos** y los **trastornos bipolares** (DSM-IV-TR). Múltiples estudios epidemiológicos muestran la alta prevalencia comórbida de trastornos del estado de ánimo y el consumo de sustancias. La relación etiopatogénica entre los trastornos del estado de ánimo y los TUS es compleja, por eso hay varias hipótesis de la relación entre ambos trastornos, las principales son las siguientes:

- Las alteraciones del estado de ánimo predisponen al consumo de sustancias, lo que se conoce como *hipótesis de la automedicación*.
- Las alteraciones del estado de ánimo son el resultado de las dificultades psicosociales de la adicción.
- Las alteraciones del estado de ánimo son consecuencia de los cambios neuroquímicos producidos por la intoxicación y la abstinencia.
- Las alteraciones del estado de ánimo coexisten con el consumo de sustancias en un sujeto con otro trastorno subyacente.

El trastorno más prevalente es el trastorno depresivo mayor (TDM) y está asociado al consumo de sustancias como la cocaína y el alcohol. La existencia de TDM se asocia con peor curso clínico en los pacientes con TUS (Hasin et al., 2002). Además, la presencia de episodios de depresión mayor se considera como un factor de predicción de recaída en el consumo de sustancias (Landheim et al., 2006).

Con respecto al alcohol, que es el objeto de estudio de esta tesis, los pacientes con TUA tienen de 2 a 4 veces más riesgo de padecer un trastorno depresivo a lo largo de su vida que aquellas personas que no presentan dependencia al alcohol (Hasin et al., 2005, 2007; Kessler et al., 1997; Ross, 1995). Los factores que predisponen a la aparición de episodios depresivos en pacientes con TUA son: ser mujer, tener antecedentes familiares de trastornos afectivos, tener un comienzo temprano en el consumo abusivo de alcohol, haber tenido divorcios, tener un nivel socioeconómico bajo, haber tenido antecedentes personales de trastornos de ansiedad, la comorbilidad con otros TUS y los intentos de suicidio.

1.3.2. Trastornos de ansiedad

Los trastornos de ansiedad son un conjunto de trastornos entre los cuales se recoge la ansiedad generalizada, el trastorno de pánico, el trastorno por estrés postraumático (TEPT), fobias específicas, fobias sociales y los trastornos obsesivo-compulsivos (DSM-IV-TR). La prevalencia de diagnóstico de ansiedad encontrada en los pacientes consumidores de alcohol es de 19% según el Estudio ECA (Regier et al., 1990). Sin embargo, dentro de este conjunto de trastornos, en población con TUA destaca la elevada prevalencia de TEPT entre un 25% y 42% (Jacobsen et al., 2001).

Otros estudios epidemiológicos muestran elevada asociación entre los distintos trastornos de ansiedad y los TUS (Merikangas et al., 1998). El 27% de pacientes con trastorno de pánico sin agorafobia sufren un TUS comórbido y esa comorbilidad asciende al 37,3% en el caso del trastorno de pánico con agorafobia (Kessler et al., 2007). La National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC) encuentra un 18% de prevalencia en el último año de comorbilidad entre TUA y los trastornos de ansiedad, siendo la fobia específica la más prevalente (10,5%), aunque los trastornos que tienen mayor riesgo de aparecer junto con TUS respecto a la población no consumidora también serían los trastornos de ansiedad generalizada y el trastorno de pánico sin agorafobia (Grant et al., 2004).

1.3.3. Trastornos psicóticos

Los trastornos psicóticos son un conjunto de trastornos que tienen síntomas psicóticos como característica definitoria o un grave deterioro en la evaluación de la realidad. En este conjunto de trastornos se incluye la esquizofrenia, el trastorno esquizofreniforme, el trastorno esquizoafectivo, el trastorno psicótico breve y el trastorno afectivo con síntomas psicóticos. El término psicótico se refiere a las ideas delirantes, a cualquier alucinación manifiesta, al lenguaje desorganizado o al comportamiento desorganizado o catatónico. Aunque existe una fuerte relación en pacientes con TUS con experiencias psicóticas atenuadas de tipo cognitivo-perceptual (Fonseca-Pedrero et al., 2016), la prevalencia de trastornos psicóticos en población con TUA es de un 4% (Engelhard et al., 2015). El patrón de consumo en este tipo de pacientes es más irregular que los que no presentan trastornos psicóticos, presentando alteraciones conductuales, comportamiento hostil y conductas suicidas.

Los efectos euforizantes relacionados con el consumo de alcohol son menores en los pacientes con esquizofrenia, que describen mayores síntomas negativos tras la intoxicación. Los pacientes con esquizofrenia que consumen alcohol presentan mayor comorbilidad con otras enfermedades médicas y presentan menor eficacia de los neurolépticos, al aumentar el alcohol su metabolismo hepático y disminuir sus valores séricos, necesitando dosis cada vez mayores.

1.3.4. Trastornos de la personalidad

En estudios epidemiológicos se muestra una elevada comorbilidad entre los trastornos por uso de sustancias y los trastornos de personalidad, especialmente los del *cluster* B, y específicamente el trastorno límite de la personalidad y el trastorno antisocial de la personalidad. También hay estudios que señalan una asociación con trastornos del *cluster* C, en especial con el evitativo, dependiente, y también se ha visto asociación frecuente con trastorno paranoide. En pacientes con TUA, los hombres tienen mayores prevalencias en trastornos de personalidad, mientras que las mujeres tienen mayor presencia de otro tipo de trastornos psiquiátricos (Ávila Escribano et al., 2007). También existen evidencias que sugieren que los trastornos de personalidad se asocian más a otros TUS, porque aumentan los problemas conductuales, la severidad clínica y las dificultades sociales (Salom et al., 2014). La prevalencia en pacientes con TUS es bastante elevada, entre un 35%-73%, planteándose así diferentes conceptualizaciones y modelos sobre la posible relación entre ambas patologías, en la actualidad la etiología de la adicción se considera mejor descrita como modelos de estrés-diátesis bioconductual, en lo que el inicio y evolución de la adicción resultaría de una interacción recíproca continua entre las vulnerabilidades biológicas, psicológicas y los recursos del individuo, además de sus circunstancias psicosociales.

Existen tres vías que se pueden distinguir hacia el desarrollo de TUS, en las cuales los factores de personalidad tendrían un importante papel etiológico: la vía de la desinhibición conductual (mayores rasgos antisociales e impulsividad y bajo en evitación de daños), la de la reducción del estrés (elevada reactividad al estrés y labilidad afectiva) y la de la sensibilidad a la recompensa (rasgos como la búsqueda de novedad y extraversión), las cuales explicarían la mayor parte de la comorbilidad observada entre los trastornos de personalidad y los TUS (Verheul & Van de Brink, 2000).

Estas vías propuestas podrían relacionarse con alteraciones en distintos circuitos neurales o sistemas de neurotransmisión: La desinhibición conductual y la impulsividad podrían relacionarse primariamente con un déficit serotoninérgico. La reactividad al estrés o sensibilidad a la ansiedad, podría relacionarse con la excitabilidad neuronal aumentada por inhibición reducida desde el sistema glutamato-GABA. La sensibilidad a la recompensa o la extroversión podrían relacionarse con hiperreactividad dopaminérgica u opioide.

Trastorno límite de la personalidad

El trastorno límite de la personalidad se caracteriza por tener un patrón de inestabilidad en las relaciones interpersonales, la autoimagen y la afectividad que comienza al principio de la edad adulta. Este trastorno se caracteriza por una elevada impulsividad e inestabilidad emocional y comparte rasgos con el trastorno por abuso de alcohol. Casi el 50% de los individuos con este trastorno, tiene TUA a lo largo de la vida (Wilson et al., 2006). Los criterios diagnósticos de este trastorno aparecen resumidos en la Tabla 9.

Tabla 9: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para el Trastorno límite de la personalidad

- (1) esfuerzos frenéticos para evitar un abandono real o imaginado
- (2) un patrón de relaciones interpersonales inestables e intensas caracterizado por la alternancia entre los extremos de idealización y devaluación
- (3) alteración de la identidad: autoimagen o sentido de sí mismo acusada y persistentemente inestable
- (4) impulsividad en al menos dos áreas, que es potencialmente dañina para sí mismo
- (5) comportamientos, intentos o amenazas suicidas recurrentes, o comportamientos de automutilación
- (6) inestabilidad afectiva debida a una notable reactividad del estado de ánimo
- (7) sentimientos crónicos de vacío
- (8) ira inapropiada e intensa o dificultades para controlar la ira

Trastorno antisocial de la personalidad

El trastorno antisocial de la personalidad se caracteriza por tener un patrón general de desprecio y violación de los derechos de los demás, que comienza en la infancia o el principio de la adolescencia. Las probabilidades de desarrollar un trastorno antisocial de la personalidad en la vida adulta aumentan si el sujeto presenta un trastorno temprano disocial (antes de los 10 años) y un trastorno por déficit de atención con hiperactividad asociado. El maltrato o el abandono en la infancia, el comportamiento inestable de los padres o la inconsistencia en la disciplina por parte de los padres aumentan las probabilidades de que un trastorno disocial evolucione hasta un trastorno antisocial de la personalidad. La prevalencia de este trastorno en población general es aproximadamente del 3% en varones y del 1% en mujeres pero es de los trastornos más prevalentes en población de TUS. Cuando el trastorno antisocial de la personalidad en un adulto está asociado a un trastorno relacionado con sustancias, no se establece el diagnóstico de trastorno antisocial de la personalidad a no ser que los signos del trastorno antisocial también hayan aparecido en la infancia y hayan continuado hasta la edad adulta. Los estudios epidemiológicos demuestran una prevalencia entre el 15-25% en personas con diagnóstico de TUA. Los criterios diagnósticos de este trastorno aparecen resumidos en la Tabla 10.

Tabla 10: Criterios diagnósticos DSM-IV TR para el Trastorno antisocial de la personalidad

- A. Un patrón general de desprecio y violación de los derechos de los demás que se presenta desde la edad de 15 años, como lo indican tres (o más) de los siguientes ítems:**
- (1) fracaso para adaptarse a las normas sociales en lo que respecta al comportamiento legal, como lo indica el perpetrar repetidamente actos que son motivos de detención
 - (2) deshonestidad, indicada por mentir repetidamente, utilizar un alias, estafar a otros para obtener un beneficio personal o por placer
 - (3) impulsividad o incapacidad para planificar el futuro
 - (4) irritabilidad y agresividad, indicados por peleas físicas o agresiones
 - (5) despreocupación imprudente por su seguridad o la de los demás
 - (6) irresponsabilidad persistente, indicada por la incapacidad de mantener un trabajo con constancia o de hacerse cargo de obligaciones económicas
 - (7) falta de remordimientos, como lo indica la indiferencia o la justificación del haber dañado, maltratado o robado a otros
- A. El sujeto tiene al menos 18 años**
- B. Existen pruebas de un trastorno disocial que comienza antes de la edad de 15 años**
- C. El comportamiento antisocial no aparece exclusivamente en el transcurso de una esquizofrenia o un episodio maniaco**

1.3.5. Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)

El TDAH es un trastorno complejo y multifactorial caracterizado por un patrón general de inatención, hiperactividad y/o impulsividad (APA, 2000; Faraone & Biederman, 2005). Los pacientes con TDAH y TUS presentan una menor respuesta a tratamiento por adicciones, así como tasas más bajas de remisión y mayor cronicidad de la problemática (Wilens & Upadhyaya, 2007). El trastorno de TDAH en la infancia se asocia con un aumento significativo en el riesgo de desarrollar un TUA en la edad adulta. En los estudios con muestra adulta de pacientes TDAH se han encontrado tasas de abuso o dependencia de alcohol del 17 al 45%.

Los estudios en neuroimagen han permitido identificar anormalidades funcionales y estructurales en diferentes áreas cerebrales, como los sistemas fronto-subcorticales o el circuito cíngulo-frontal-parietal, que también están involucrados en la neurobiología de los TUS (Wilens & Spencer, 2010; Volkow et al., 2009). Estas y otras alteraciones neuroanatómicas permitirían explicar los déficits a nivel atencional así como en los sistemas de motivación y recompensa que presentan los pacientes con TDAH (Volkow et al., 2009; Stark et al., 2011). El déficit de recompensa característico del TDAH se manifiesta por la aversión al retraso de la gratificación y por la preferencia por pequeñas recompensas inmediatas, y podría estar mediado por la menor disponibilidad de los receptores de dopamina D2 y D3 en el sistema de recompensa y motivación. De hecho, la vía dopaminérgica del mesoaccumbens que proyecta desde el ATV en el cerebro medio hasta el NAc, parece subyacer a los déficits motivacionales y de recompensa observados en estos trastornos, por lo tanto esta podría ser una posible causa de menor respuesta a la recompensa y mayor vulnerabilidad hacia los TUS (Volkow et al., 2009).

1.4. Instrumentos de evaluación psiquiátrica

1.4.1. Manuales diagnósticos

La Clasificación Internacional de Enfermedades, décima versión (CIE-10) (versión en español) es un manual que determina la clasificación y codificación de las enfermedades y una amplia variedad de signos, síntomas, hallazgos anormales, denuncias, circunstancias sociales y causas externas de daños y/o enfermedades. La CIE-10 se desarrolló por la OMS, en 1992 y se va actualizando cada tres años (WHO, 1992).

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) (American Psychiatric Association, 2000) es el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la asociación americana de psiquiatría, el cual contiene una clasificación exhaustiva de los trastornos mentales. La edición con la que trabajamos es la cuarta en su versión revisada (DSM-IV-TR). Este manual proporciona descripciones claras de las categorías diagnósticas, con el fin de que los clínicos y los investigadores de las ciencias de la salud puedan diagnosticar, estudiar e intercambiar información y tratar los distintos trastornos mentales. Los criterios diagnósticos del DSM-IV-TR establecen tres categorías para especificar el diagnóstico por TUS:

- **Primarios:** Trastornos mentales no inducidos por sustancias ni debidos a enfermedades médicas.
- **Efectos esperados:** Se recogen los síntomas considerados como habituales en una situación de intoxicación o abstinencia de una sustancia.
- **Inducidos por sustancias:** Síntomas excesivos en relación con lo esperado tras la intoxicación o abstinencia de una sustancia.

En la última versión de este manual, DSM-V, se sustituye el término primario por el de independiente (O'Brien, 2012). La crítica fundamental a la distinción actual es que el término primario da por supuesto que la sintomatología del trastorno siempre va a ser previa al consumo de sustancias. En la introducción del concepto independiente se presupone que los síntomas también pueden estar presentes en épocas de abstinencia o posteriores al consumo.

Las diferencias en los criterios diagnósticos reflejada en los instrumentos utilizados pueden originar diferencias en los resultados encontrados. Por lo tanto, la identificación de forma fiable y válida de la presencia de otro trastorno psicopatológico en sujetos consumidores de sustancias es un punto relevante para los profesionales clínicos a la hora de establecer una línea efectiva de tratamiento.

La precisión de la evaluación es importante también en otras áreas, como la epidemiología, donde es necesario poder realizar los diagnósticos de comorbilidad para poder planificar los recursos asistenciales necesarios con la finalidad de atender a esta población de forma efectiva (Vergara et al., 2012).

1.4.2. Instrumentos diagnósticos específicos en adicciones

Como en la mayoría de las patologías, la base para un buen plan de tratamiento está en la realización de una evaluación exhaustiva al paciente y a su círculo cercano si es posible, donde la principal herramienta es la entrevista, en este caso motivacional, para obtener un completo análisis funcional del caso y motivarle en la puesta en tratamiento.

Los siguientes cuestionarios son específicos de consumo de sustancias y buenas herramientas de detección de la dependencia al alcohol:

- **Test CAGE** (Ewing, 1984)

Es un test de prevención que detecta el consumo de riesgo de alcohol y un comportamiento perjudicial para la salud. Y está compuesto por cuatro preguntas cerradas con respuesta dicotómica (Figura 7). 1 punto indica algún problema con el alcohol; 2 puntos o más indican la necesidad de la evaluación de la dependencia. Es un test de administración rápida, se utiliza en atención primaria y al inicio de algunas pruebas de carácter neuropsicológico. Tiene el inconveniente de dar falsos positivos porque una puntuación mayor de 2 indica un problema de abuso al alcohol.

Figura 7: Test CAGE

1 ¿Le ha molestado alguna vez la gente criticándole su forma de beber?	Sí (1) No (0)
2 ¿Ha tenido alguna vez la impresión de que debería beber menos?	Sí (1) No (0)
3 ¿Se ha sentido alguna vez culpable por su costumbre de beber?	Sí (1) No (0)
4 ¿Alguna vez lo primero que ha hecho por la mañana ha sido beber para calmar sus nervios o para librarse de la resaca?	Sí (1) No (0)

- **AUDIT** (Test de Identificación de Trastornos Relacionados con el Uso de Alcohol)(Babor et al., 2001)

Este cuestionario detecta consumo de riesgo e identifica un posible TUA. La puntuación va de 0 a 40 puntos como máximo. Al ser un test de cribado, a una puntuación mayor de 8 se le recomienda una evaluación de un TUA (Figura 8).

Figura 8: Test AUDIT

1 ¿Con qué frecuencia consumes bebidas alcohólicas?	Nunca (0) Una o menos veces al mes (1) 2 a 4 veces al mes (2) 2 o 3 veces a la semana (3) 4 o más veces a la semana (4)	6 ¿Con qué frecuencia, en el curso del último año, has necesitado beber en ayunas para recuperarte después de haber bebido mucho el día anterior?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)
2 ¿Cuántas bebidas alcohólicas consumes normalmente cuando bebes?	1 o 2 (0) 3 o 4 (1) 5 o 6 (2) 7 a 9 (3) 10 o más (4)	7 ¿Con qué frecuencia, en el curso del último año, has tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)
3 ¿Con qué frecuencia te tomas 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día?	1 o 2 (0) 3 o 4 (1) 5 o 6 (2) 7 a 9 (3) 10 o más (4)	8 ¿Con qué frecuencia, en el curso del último año, no has podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque habías estado bebiendo?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)
4 ¿Con qué frecuencia, en el curso del último año has sido incapaz de parar de beber una vez que habías empezado?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)	9 Tú o alguna otra persona, ¿habéis resultado heridos porque habías bebido?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)
5 ¿Con qué frecuencia en el curso del último año, has tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	Nunca (0) Menos de una vez al mes (1) Mensualmente (2) Semanalmente (3) A diario o casi a diario (4)	10 ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario han mostrado preocupación por tu consumo de alcohol, o te han sugerido que dejes de beber?	No (0) Sí, pero no en el curso del último año (2) Sí, en el último año (4)

Además, en el ámbito clínico y de investigación, disponemos de distintas entrevistas diagnósticas semi-estructuradas basadas en los criterios diagnósticos del DSM-IV TR o CIE-10 para una evaluación exhaustiva del paciente.

En la evaluación del paciente, se obtiene el historial psicosocial completo, en el que se recogen los antecedentes familiares, la conducta motora, el estado de cognición actual, la conducta fisiológica y la afectiva. También las consecuencias del consumo físicas/psicológicas e interpersonales a corto y a largo plazo, el estilo de vida actual y anterior, la historia detallada de la adquisición al problema desde el inicio y cambios producidos por la adicción y la motivación para el tratamiento. Las entrevistas de evaluación más empleadas debido a su valor psicométrico, validez y fiabilidad son las siguientes:

- **CIDI** (*Composite International Diagnostic Interview*) (Janca et al., 1994)

La entrevista CIDI es una entrevista estructurada diseñada para la evaluación de los trastornos mentales de acuerdo con los criterios CIE-10 y DSM-IV. Está diseñada para fines clínicos y de investigación que evalúa la prevalencia y la gravedad de distintos trastornos, entre ellos los trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, TUS y trastornos de inicio en la infancia (como trastornos de personalidad y trastornos psicóticos) (Kessler & Üstün, 2004). Además, es capaz de medir la carga médica que conllevan estos trastornos, como el uso de medicamentos, la necesidad de servicios y las posibles barreras que pueden surgir a la hora de realizar el tratamiento.

- **PRISM** (*Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders*) (Hasin et al., 1996)

La entrevista diagnóstica PRISM es el principal instrumento utilizado para valorar los trastornos psiquiátricos y TUS. Se trata de una entrevista clínica semi-estructurada diseñada para resolver los problemas de diagnóstico en personas con un consumo elevado de sustancias y/o alcohol, evaluando en un primer módulo preguntas del historial de consumo del sujeto, arrojando diagnóstico de abuso y dependencia tanto en el último año como en el pasado.

Además, evalúa 20 trastornos del Eje I y los dos trastornos del Eje II más prevalentes en esta población: el trastorno límite de la personalidad y el trastorno antisocial de la personalidad. Los diagnósticos se realizan en dos marcos temporales de evaluación. Por un lado, la entrevista valora los trastornos actuales, es decir, los que están presentes durante el último año. Por el otro, evalúa los trastornos previos, es decir, los definidos con anterioridad al último año. De manera general, la prevalencia diagnóstica presentada por un sujeto “a lo largo de la vida” incluiría la totalidad de los diagnósticos enunciados con anterioridad observados en ambos periodos temporales, es decir, los actuales más los previos.

Una de las características más importantes de este instrumento es que permite diferenciar los trastornos inducidos por sustancias, así como los síntomas esperados del efecto de la intoxicación y la abstinencia. El criterio establecido por la PRISM para que un trastorno psiquiátrico pueda ser considerado inducido por la sustancia, es que debe ocurrir en el contexto de un consumo patológico de la sustancia, en cualquiera de estas dos situaciones:

- Intoxicación crónica, es decir, un consumo de cuatro o más días a la semana durante un mes
- Atracónes, durante un periodo de consumo de tres días continuados.

Para diferenciar los síntomas psiquiátricos inducidos de los esperados durante la intoxicación o la abstinencia, se debe determinar si hubo un cambio brusco en el patrón de consumo (Hasin et al., 1996; Torrens et al., 2004). Además, esta entrevista presenta buena fiabilidad test-retest, validez y fiabilidad inter-examinadores (el coeficiente Kappa que ajusta el efecto del azar en la concordancia observada en variables categóricas oscila entre 0,66 y 1,00) (Morguello et al., 2006).

Otros test que se han utilizado para una evaluación más completa de la población con TUS, que aunque no evalúan específicamente conductas adictivas, evalúan trastornos asociados a ellas son:

- **WURS** (*Wender-Utah Rating Scale*) (Ward, 1993)

La escala WURS es una escala se utiliza para la evaluación retrospectiva del diagnóstico de TDAH en pacientes adultos. Se trata de un cuestionario auto-aplicado de 61 ítems, entre los que se han seleccionado 25 por su capacidad para

discriminar a los pacientes adultos, con antecedentes de TDAH en la infancia, de otras poblaciones como controles y depresivos. La WURS ha demostrado una consistencia interna y una estabilidad temporal satisfactorias en varios trabajos. Se recogen preguntas sobre estados de ánimo, problemas de relación con familiares, compañeros y figuras de autoridad, problemas médicos, escolares y académicos. El coeficiente α de Cronbach (que mide la consistencia del instrumento) para esta subescala es de 0,94. El punto de corte de 32 optimizaba sensibilidad (91,5%) y especificidad (90,8%). Los valores predictivos positivo y negativo son 81 y 96%, respectivamente (Rodríguez-Jiménez et al., 2001).

- **UPPS-P** (*negative Urgency, lack of Premeditation, lack of Perseverance, Sensation seeking, Positive urgency*) (Lynam et al., 2006)

Es un instrumento multi-dimensional que evalúa el rasgo de impulsividad a través de la puntuación de 5 dimensiones que contribuyen al comportamiento impulsivo: urgencia negativa, falta de perseverancia, falta de premeditación, búsqueda de sensaciones y urgencia positiva. La escala fue estandarizada en castellano (Verdejo et al., 2010) y se obtienen 5 puntuaciones distintas por dimensión que permiten una puntuación total relacionada con la impulsividad. Las diferentes dimensiones de la escala están correlacionadas moderadamente por lo que miden distintos aspectos de la impulsividad, y este aspecto la dota de mayor validez. Debido a las óptimas propiedades psicométricas de la escala, con un coeficiente α de Cronbach entre 0,61 y 0,81 para las distintas dimensiones, ésta se puede considerar un buen instrumento en contextos clínicos e investigación (Cándido et al., 2012).

1.5. Marcadores biológicos relacionados con la adicción

Los marcadores biológicos son huellas objetivas que pueden ser medidas y evaluadas como indicadores de un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta a una intervención terapéutica (farmacológica o no).

Consideramos necesario el estudio del sustrato biológico que subyace a los TUS y a la comorbilidad psiquiátrica para la elaboración de tratamientos efectivos en la adicción a sustancias. La búsqueda de biomarcadores fiables para estos trastornos lleva años siendo de interés en el ámbito de la investigación en adicciones. Es importante el carácter objetivo de la prueba dado que se evita el sesgo subjetivo de los síntomas (referidos por el paciente y evaluados por el entrevistador).

El motivo de análisis de distintos marcadores periféricos en sangre, viene del creciente interés psiquiátrico por ampliar el conocimiento que se tenía de los procesos involucrados en los sistema inflamatorio e inmunológico que acompañan a los distintos TUS (Domenici et al., 2010; Domenici & Muglía, 2007) y a su potencial utilidad para estratificar a los pacientes, en especial cuando la fenotipación clínica no ayuda a mejorar los resultados terapéuticos al no discriminar a subtipos de pacientes que podrían diferenciarse por la prueba biológica objetiva. De entre las potenciales moléculas que podrían servir como biomarcadores, se ha puesto énfasis en aquellas relacionadas con los procesos inflamatorios e inmunológicos, como los lípidos transmisores y las citoquinas/quimioquinas.

La señalización mediada por lípidos transmisores modula los procesos de información cerebral y las conductas asociadas al consumo de determinados psicoestimulantes, entre ellos el alcohol. La información que procesan estos sistemas afecta a la liberación de transmisores, a la plasticidad, sinaptogénesis y neurogénesis. Los lípidos más importantes que se han llevado a estudio en los procesos adictivos son cuatro tipos fundamentalmente: las aciletanolamidas y los acilglicerol cannabinoide, las aciletanolamidas sin propiedades cannabinoide, los eicosanoides derivados del ácido araquidónico y el ácido lisofosfatídico (Orio et al., 2013). Además, es creciente el estudio de las respuestas inmunológicas de proteínas de señalización pro-inflamatorias por su participación en procesos de remodelación neuronal, por lo que también sentimos gran interés en el estudio de las posibles respuestas inflamatorias desencadenadas en procesos de adicción al alcohol.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio específico del comportamiento de tres tipos de marcadores biológicos distintos en modelos humanos en relación a los TUA y comorbilidad psiquiátrica. Estos tres tipos de moléculas se pueden dividir en dos categorías:

- Moduladores del estado homeostático interno o derivados de ácidos grasos, generalmente moléculas generadas a partir de la membrana celular. Bioquímicamente estas sustancias conforman una familia de moléculas de señalización lipídica, que tienen un papel fundamental en la modulación de diferentes condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas en SNC y tejidos periféricos. Estos transmisores incluyen entre otros a las **aciletanolamidas** y a los **monoacilglicerol**.
- Mediadores periféricos del sistema inmunológico. Las **quimioquinas** son moléculas mediadoras de procesos inflamatorios, con capacidad quimioatrayente de células del sistema mononuclear fagocítico. Su presencia en el cerebro ha sido documentada ampliamente, así como su participación en procesos de comunicación intercelular neuroinflamación y plasticidad neuronal, incluyendo neurogénesis (Haaron et al., 2012; Arnoux & Audinat, 2015).

1.5.1. Sistema endocannabinoide

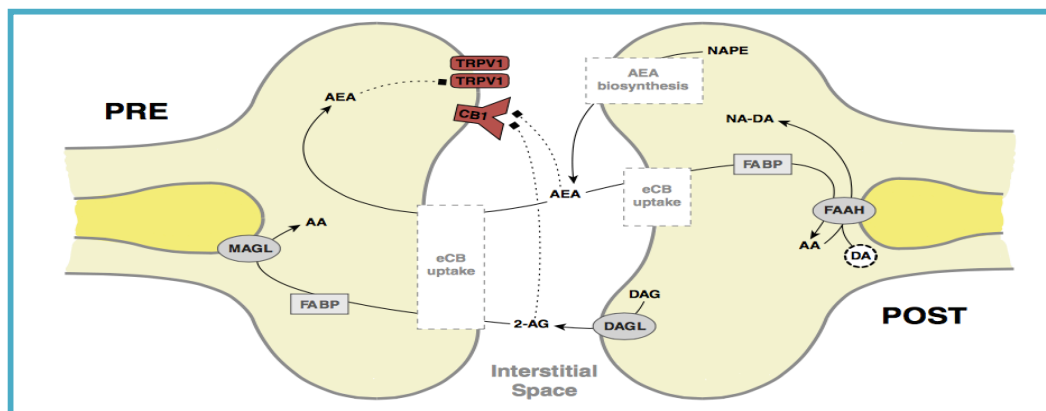
El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización lipídica constituido por los receptores cannabinoide, los ligandos endógenos (endocannabinoide) y la maquinaria enzimática implicada en su síntesis e inactivación. Los endocannabinoide (eCBs) actúan como mensajeros intercelulares alejados de su lugar de síntesis y liberación (Giuffrida et al., 2000; Rodríguez de Fonseca, 2001). Hasta la fecha se han caracterizado y clonado dos tipos principales de receptores CB₁ y CB₂, ambos pertenecientes a la super familia de receptores acoplados a proteína G. El receptor CB₁ se expresa principalmente a nivel central, aunque también se ha encontrado en tejidos periféricos (ej. músculo, tracto intestinal, páncreas, hígado y tejido adiposo). El receptor CB₂ se localiza principalmente en células inmunes, aunque hay evidencias que también sugieren

su expresión a nivel central. Adicionalmente, se han identificado otros receptores, como el receptor de vanilloides tipo 1 (TRPV1), los receptores huérfanos acoplados a proteína G, GPR55 y GPR119 y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo alfa (PPAR- α) y beta (PPAR- β), como posibles dianas para los eCBs.

Los dos principales eCBs identificados son la araquidoniletanolamida (anandamida, AEA) y el 2- araquidonilglicerol (2-AG), ambos derivados químicos del ácido araquidónico. Se ha visto que los endocannabinoides son moduladores importantes del apetito y del gasto energético (Reyes-Cabello et al., 2012). La AEA también pertenece a una clase de lípidos mucho más extensa denominada aciletanolamidas, formados a partir de fosfolípidos de membrana u que incluye a otras moléculas no cannabinoides como la monoinsaturada aciletanolamida (OEA) y la saturada palmitiletanolamida (PEA). Por otro lado, el 2-AG pertenece a otra familia de moléculas de señalización, los monoacilgliceroles que están presentes en el SNC con niveles incluso más abundantes que las aciletanolamidas y tienen efectos neuromoduladores, principalmente cannabinoides. Estas moléculas incluyen a la mencionada 2-AG, el 2-oleilglicerol (2-OG) y el 2-linoleilglicerol (2-LG).

Las rutas de biosíntesis y degradación de las aciletanolamidas y monoacilgliceroles tienen cascadas enzimáticas muy complejas que son cruciales en la regulación de sus niveles endógenos. Las aciletanolamidas se forman a partir de un precursor fosfolípido, N-acilfosfatidiletanolamina a través de diferentes rutas biosintéticas, mientras que 2-AG es un derivado del 1,2-diacilglicerol. La inactivación de la señal endocannabinoide y congéneres es medida por recaptación celular, seguida de hidrólisis intracelular. La hidrolasa de ácido graso (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las principales enzimas responsables de la degradación de aciletanolamidas y monoacilgliceroles, respectivamente (Gaetani et al., 2003; Kinsey et al., 2011). La Figura 9 recoge una explicación de las rutas de síntesis y degradación de los endocannabinoides. La evidencia científica de distintas líneas de investigación apuntan a que los efectos adictivos de las sustancias de abuso están modulados por la alteración de las señales cannabinoides. Se sugiere que los endocannabinoides y sus congéneres están involucrados en la adquisición y mantenimiento de comportamientos de toma de sustancias y procesos relacionados con la adicción (Serrano & Parsons, 2011; Bilbao et al., 2013).

Figura 9: Organización sináptica del sistema endocannabinoid<e



AEA y 2-AG se sintetizan en la célula postsináptica. La síntesis de AEA se da a través de N-araquidil-fosfatidiletanolamina (NAPE) a través de la catálisis por la fosfolipasa D (NAPE-PLD). La síntesis de 2-AG viene de la hidrólisis de 1,2-diacilglicerol (DAG) a través de las lipasas DAGL α y DAGL β . Una vez liberadas AEA y 2-AG en la hendidura sináptica ejercen sus efectos a través de receptores CB1 en los terminales presinápticos. AEA es un potente agonista de TRPV1. La terminación de la señalización se inicia por la recaptación celular, y una vez dentro de la célula se transporta vía chaperona FABP (proteína vinculante de ácido graso) para su escisión hidrolítica. La degradación de AEA se produce en las células postsinápticas a través del ácido graso amida hidrolasa (FAAH) que escinde AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamida. FAAH puede transformar AA y otros neurotransmisores en mitades n-araquidil como la dopamina n-araquidil (NADA) que tienen una potente bioactividad en TRPV1 y receptores CB1.

Fuente: Serrano & Parsons, 2011

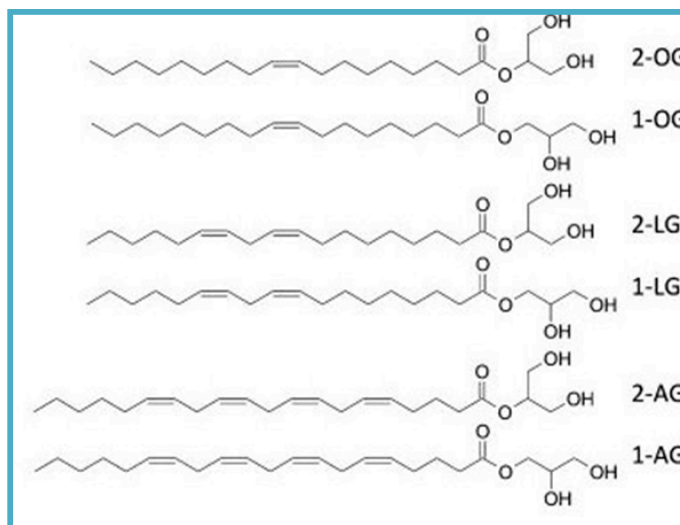
1.5.2.Monoacilgliceroles

Los monoacilgliceroles son ésteres de glicerol unidos a una cadena de ácido graso cuya función biológica es principalmente de señalización. En la Figura 10, aparecen los principales monoacilgliceroles estudiados .

De todos ellos, el compuesto mejor caracterizado a día de hoy es el endocannabinoide 2-AG. Éste compuesto se produce a partir de la hidrólisis del 1,2-diacilglicerol (DAG) por la acción de 2 lipasas específicas (DAGL α / β) (Stella et al., 1997), mientras que la MAGL es la principal enzima responsable de su degradación (Dinh et al., 2002).

Figura 10: Principales monoacilgliceroles.

Fuente: Pastor et al., 2014



La función de los monoacilgliceroles varía según los receptores sobre los que actúan. Se sabe que 2-AG tiene afinidad con los receptores CB₁ y CB₂, lo que le confiere propiedades cannabinoides y están relacionados con la adquisición y mantenimiento de las conductas adictivas y otros procesos asociados a la adicción (Serrano & Parsons, 2011; Bilbao et al., 2013).

♦ 2-Araquidonilglicerol (2-AG) ♦

Es el principal endocannabinoide endógeno y agonista completo de ambos receptores cannabinoides. Es ligando principal (molécula de unión) para el receptor CB₂. Su actividad está también ligada a la preferencia alcohólica, así como al desarrollo de tolerancia a esta sustancia en modelos animales (Basavarajappa et al., 2005; Caillé et al., 2007; Malinen et al., 2009; Serrano et al., 2012).

Se ha estudiado que la señal de 2-AG en neuronas glutamatérgicas es esencial para la adaptación de los animales a las situaciones aversivas (Guggenhuber et al., 2015). También, se ha visto que los niveles de 2-AG disminuyen en algunas regiones cerebrales cuando se produce la exposición de etanol a corto plazo (Rubio et al., 2007, 2009). Por el contrario, ante la exposición crónica los niveles de 2-AG tienden a aumentar en las áreas límbicas y en el NAc (González et al., 2002, 2004), a la vez que se observan disminuciones significativas en áreas como amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (Malinen et al., 2009; Rubio et al., 2007).

♦ 2-Linoleilglicerol (2-LG) ♦

Es una molécula insaturada derivada del ácido linoleico y tiene funciones aún desconocidas aunque se ha descrito recientemente cierta actividad cannabinoide y relacionada a las acciones de 2-AG (Ben-Shabat et al., 1998). Un estudio reciente realizado por nuestro grupo de investigación en una población de pacientes con trastornos por uso de cocaína ha mostrado que las concentraciones plasmáticas de 2-LG disminuyen según el historial de consumo (Pavón et al., 2013).

♦ 2-Oleilglicerol (2-OG) ♦

Es una molécula insaturada derivada del ácido oleico. Se sabe que se genera en el intestino y sin embargo, a diferencia del 2-AG, hay una escasez de trabajos sobre las acciones y funciones de este derivado lipídico. Se produce durante la digestión en el intestino por hidrólisis de los triglicéridos de la dieta (Mu & Høy, 2004) y ejerce sus funciones en el organismo mediante la activación del receptor GPR119 que estimula la liberación de incretina, que es un péptido similar al glucagón (Hansen et al., 2012; Silvestri & Di Marzo, 2013). También se ha visto que el 2-OG se expresa a nivel central, aunque su distribución no es igual en todas las regiones y, además se modifica en respuesta al estrés (Roberts et al., 2012).

Como hemos señalado anteriormente, ratas con alteraciones en niveles 2-AG exhiben comportamientos de mayor ansiedad, por lo que estas moléculas parecen ser esenciales en la adaptación de situaciones aversivas (Guggenhuber et al., 2015). Estas alteraciones producen cambios en el comportamiento en tareas como la exploración reducida en campo abierto, el aumento de comportamientos

ansiosos y la reducción de la neurogénesis. La supresión de niveles de DAGL afecta al estado emocional de los animales aumentando ansiedad, el nivel de estrés, y la respuesta de miedo (Jenniches et al., 2016). En estudios clínicos también se han demostrado incrementos en la producción de eCBs ante la respuesta a estrés de los sujetos evaluados (Hill & McEwen, 2009) y el perfil plasmático de derivados de ácidos grasos se planteó como posibles biomarcadores en trastornos crónicos complejos, incluyendo trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos y trastornos mentales (Monteleone et al., 2005; Jean-Gilles et al., 2009; Koppel et al., 2009; Quercioli et al., 2011; Desfossés et al., 2012). El cannabis produce efectos opuestos a dosis dependiente, esto es efectos ansiolíticos a dosis bajas y efectos ansiogénicos a dosis altas (Hall & Solowij, 1998; Ashton, 2001; Tournier et al., 2003; Dannon et al., 2004).

1.5.2.1. Papel de los monoacilgliceroles en adicciones

Una cantidad importante de estudios experimentales han buscado definir los distintos roles de este sistema de señalización en los distintos procesos adictivos. Las evidencias sugieren que los lípidos bioactivos como son los endocannabinoides y sus congéneres están implicados en la adquisición y mantenimiento de conductas relacionadas con el consumo de sustancias (Serrano & Parsons, 2011; Bilbao et al., 2013). Estos moduladores bioenergéticos que sirven como señales retrógradas en las sinapsis, están afectadas por la interacción de señales en el SNC (Rodríguez de Fonseca et al., 2005). En las vías mesolímbicas, tanto las transmisiones inhibitorias GABAérgicas como las excitatorias glutamatérgicas están moduladas por los eCBs, mientras la transmisión dopaminérgica no se ve afectada directamente porque los receptores CB₁ no se localizan en terminales dopaminérgicos (Fernández-Ruiz et al., 2010).

Existen evidencias claras de que los efectos reforzadores de las sustancias de abuso están moduladas por la manipulación de las señales endocannabinoides y estas moléculas están alteradas tras la exposición a las distintas sustancias de abuso (González et al., 2002; Caillé et al., 2007).

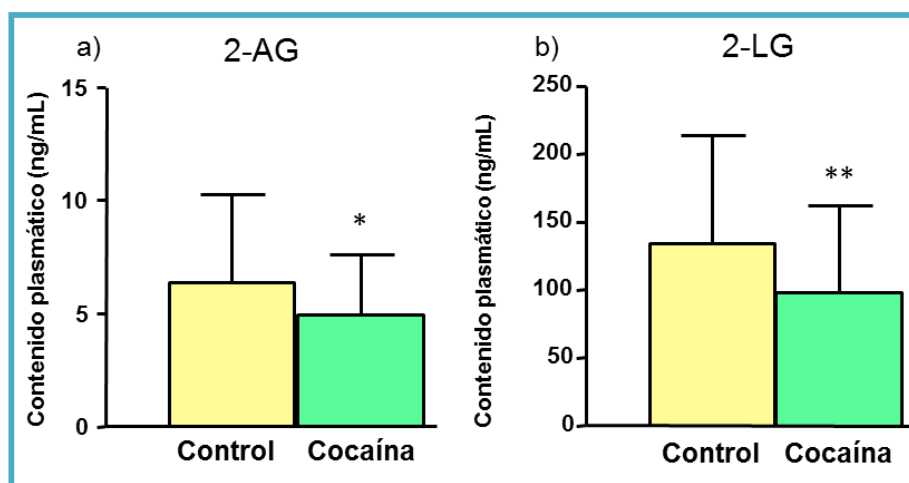
En modelos animales, la administración repetida de cannabis reduce las concentraciones en el putamen caudado, y sin embargo aumentan en el hipocampo, tallo cerebral y cerebelo (Di Marzo et al., 2000; González et al., 2004). En cuanto al alcohol, existe evidencia de que los niveles de 2-AG varían en regiones como la corteza prefrontal (Malinen et al., 2009; Rubio et al., 2007). Otros estudios realizados con opioides, obtienen concentraciones disminuidas en estriado, corteza, hipocampo, hipotálamo y prosencéfalo en dosis moderadas y altas (Viganò et al., 2003). Con respecto a los psicoestimulantes, las concentraciones de 2-AG se ven disminuidas en el prosencéfalo límbico con sustancias como el metilfenidato (Patel et al., 2003) al igual que ocurre con la cocaína. Los niveles de 2-AG decrecen en tejidos límbicos tras una exposición crónica a cocaína (González et al., 2002).

También, aunque en menor medida, se han estudiado los cambios en concentraciones plasmáticas de monoacilgliceroles, inducidos por el consumo de distintas sustancias en modelos animales. Con respecto al alcohol, a nivel general

del SEC, existen determinados polimorfismos genéticos del receptor CB₁ afectados por el consumo crónico de alcohol, realizado en una población con TUA muy similar a la nuestra (Ponce et al., 2003). En el estudio específico de 2-AG, se ve un aumento de las concentraciones de esta molécula en células cerebelares granulares, debido posiblemente a un mecanismo de adaptación neuronal causado por el consumo repetido de alcohol en población con TUA (Basavarajappa et al., 2000).

Con respecto a cambios en monoacilglicerol debido al consumo de cocaína, recientemente (ver Figura 11) un estudio clínico de nuestro grupo evaluó las relaciones de los monoacilglicerol 2-AG y 2-LG con trastornos por uso de cocaína, en una población de pacientes en abstinencia, y se encontraron concentraciones reducidas de estas moléculas según el historial de consumo (Pavón et al., 2013).

Figura 11: Niveles plasmáticos de monoacilglicerol 2-AG (a) y 2-LG (b) en pacientes con trastornos por uso de cocaína abstinentes y sujetos control



Los niveles plasmáticos de ambos monoacilglicerol en el grupo cocaína estaban reducidos al compararlos con el grupo control: 2-AG [-22% (*p<0,05)] y 2-LG [-27% (**p<0,001)]

Fuente: Pavón et al., 2013

1.5.3. Aciletanolamidas

Las aciletanolamidas son una familia de compuestos derivados de ácidos grasos saturados o insaturados conjugados con etanolamida que constituyen un sistema de señalización ubicuo y complejo con importantes funciones reguladoras en todo el organismo. A parte de las aciletanolamidas descritas antes como la AEA, a este grupo de compuestos pertenecen las monoinsaturadas oleiletanolamida (OEA) y palmitoleiletanolamida (POEA), las saturadas palmitiletanolamida (PEA) y estearileanolamida (SEA), y las poliinsaturadas linoleiletanolamida (LEA), dihomo-y-linoleiletanolamida (DGLEA), docosatetraenoiletanolamida (DEA) y docosahexaenoiletanolamida (DHEA).

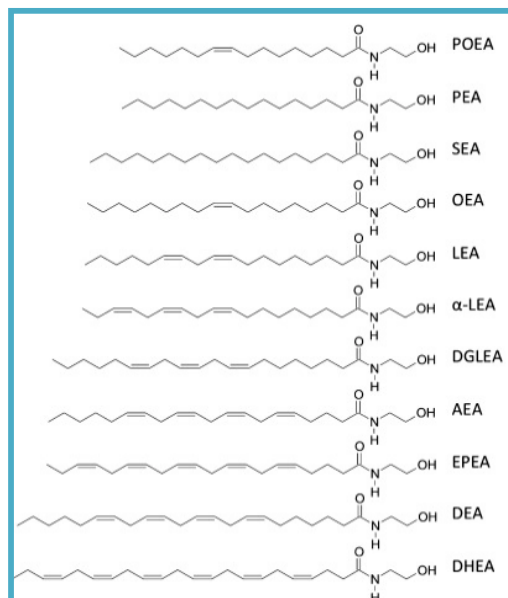
Como se puede ver en la Figura 12, las aciletanolamidas se forman dependiendo del ácido graso del que derivan. POEA deriva del ácido palmitoleico, PEA del ácido

palmítico, SEA del ácido esteárico, OEA del ácido oleico, LEA del ácido linoleico, DGLEA del ácido dihomo- γ -linolenico, AEA del araquidónico, EPEA del ácido ecosapentaenoico, DEA del docosatetraenoico y DHEA del ácido docosaheptaenoico.

Aunque las aciletanolamidas tienen funciones ampliamente divergentes, comparten mecanismos comunes biosintéticos y de degradación, que se han caracterizado en varios tejidos, particularmente en las neuronas. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, las aciletanolamidas no se almacenan en los compartimentos intracelulares de las neuronas, sino que se sintetizan y liberan a demanda en respuesta a diversos estímulos fisiológicos y patológicos. Las vías de biosíntesis y degradación para las aciletanolamidas incluyen cascadas enzimáticas muy complejas que son cruciales en la regulación de sus niveles endógenos. Están formadas a partir de la escisión de un precursor fosfolipídico, N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) siguiendo diferentes vías biosintéticas. La inactivación de la señal de las aciletanolamidas se produce a través de un mecanismo de dos pasos, que consiste en su transporte al interior celular seguido de la hidrólisis enzimática. Aunque las aciletanolamidas pueden ser hidrolizadas por diferentes enzimas, la principal responsable de su degradación en el sistema nervioso es una amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) integrada en la membrana.

Figura 12: Principales aciletanolamidas

Fuente: Pastor et al. 2014



Las distintas aciletanolamidas son capaces de llegar a receptores específicos, ya sea a través de difusión pasiva en la misma célula donde se forman, o a través de transportadores tales como lipocalinas o albúmina sérica, lo que las transporta hasta las células diana distantes, ejerciendo así una función hormonal. Las aciletanolamidas pueden producir varios efectos fisiológicos mediante su unión a gran variedad de receptores. Además de los receptores de cannabinoides y nucleares, se han encontrado otras dianas susceptibles de ser moduladas por aciletanolamidas, como el receptor TRPV1 (Zygmunt et al., 1999) y los receptores GPR119 y GPR55 (Godlewski et al., 2009; Pertwee, 2010)

♦ Oleiletanolamida (OEA) ♦

La OEA es la aciletanolamida derivada del ácido oleico. Esta molécula es capaz de activar con alta potencia al receptor nuclear PPAR- α , pero es inactiva en los receptores cannabinoides (Fu et al., 2003). Una de sus principales funciones es que actúa como un factor de saciedad, por ello se considera una diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y en los trastornos alimenticios.

La OEA interviene en la regulación del gasto energético, la motilidad gastrointestinal y la utilización de grasas mediante lipólisis. Muchas de sus respuestas fisiológicas están mediadas a través de la activación del receptor PPAR- α . Concretamente, la OEA regula la expresión de los genes dianas de este factor de transcripción implicados en la movilización y oxidación de ácidos grasos con acciones anti-obesidad (Berger & Moller, 2002; Guzman et al., 2004). Al actuar como una señal homeostática en el organismo, regula la ingesta de alimentos de alto contenido calórico y en la selección de alimentos (Téllez et al., 2013). La administración periférica de OEA reduce la ingesta de comida, efecto que no se produce si la administración es a nivel central (Fu et al, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2001). Se genera en el intestino, ante la llegada de alimentos calóricos mediante un proceso controlado por el sistema nervioso simpático y participa en el metabolismo lipídico y de glucosa. También participa en los procesos motivacionales del sistema de refuerzo cerebral y en procesos de consolidación de memoria (Campolongo et al., 2009).

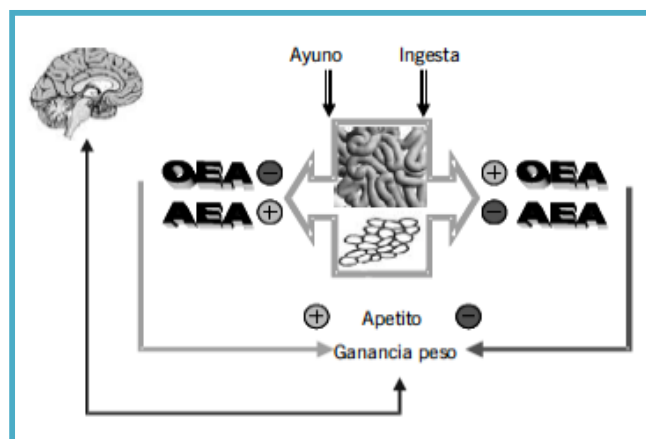
♦ Araquidoniletanolamida (Anandamida/AEA) ♦

La AEA es la aciletanolamida derivada del ácido araquidónico y fue el primer endocannabinoide que se identificó (Devane et al., 1992). Esta molécula es capaz de unirse a los receptores cannabinoides, reproduciendo la mayoría de los efectos de los compuestos activos del cannabis, incluyendo hipotermia, analgesia, catalepsia o desarrollo de la tolerancia (Fride & Mechoulam, 1993). Se ha visto que AEA inhibe la síntesis y liberación de la dopamina en el estriado y potencia las neuronas dopaminérgicas en el sistema tuberoinfundibular (Di Marzo et al., 1998).

A pesar de la similitud estructural de OEA y AEA, estas tienen efectos opuestos. Así, mientras AEA produce efectos hiperfágicos a través de la activación de los receptores CB₁ y CB₂, OEA presenta efectos supresores del apetito a través de PPAR- α .

Como se aprecia en la Figura 13, el balance AEA/OEA determina el apetito y el acúmulo de grasa en el tejido adiposo. La actuación de este sistema se produce a través del sistema nervioso periférico pero coordinado con el control hipotalámico central (Rodríguez de Fonseca, 2004). Del mismo modo, los niveles intestinales de ambas aciletanolamidas están inversamente correlacionados, por lo que OEA aumenta después de una comida, lo que resulta en una disminución de los niveles de AEA. El ayuno promueve la liberación de AEA y suprime la OEA, y la llegada de

Figura 13: Sistema AEA/OEA como regulador del apetito



El sistema AEA/OEA actúa como un regulador dual del apetito y el balance energético. El ayuno activa la liberación de AEA y se bloquea la de OEA, mientras que tras la ingesta ocurre lo contrario.

Fuente: Rodríguez de Fonseca, 2004

alimento al tubo digestivo tiene el efecto contrario (Rodríguez de Fonseca, 2004). Estas acciones opuestas sugieren un control coordinado de las respuestas de la alimentación por ambas aciletanolamidas (Gómez et al, 2002; Rodríguez de Fonseca et al., 2001).

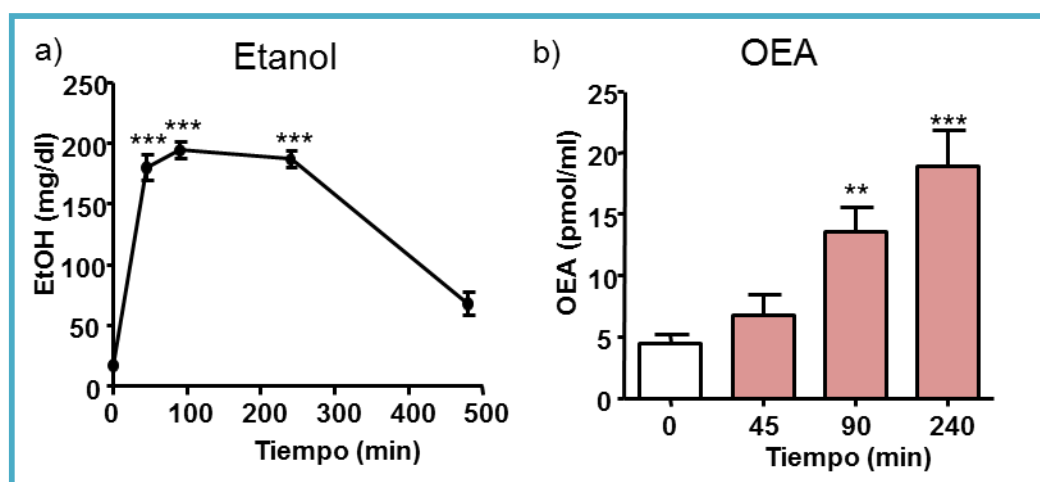
1.5.3.1. Papel de las aciletanolamidas en adicciones

Numerosas evidencias señalan que el papel de las aciletanolamidas no está limitado al control de la homeostasis energética, ya que se conoce un amplio espectro biológico de acciones, particularmente en el cerebro donde interactúan en diferentes tejidos y con otras moléculas.

Existen evidencias que sugieren que las aciletanolamidas están involucradas en la etiología de la adicción. La AEA participa en las neuroadaptaciones asociadas al desarrollo de la tolerancia al alcohol, así como su participación en otros TUS (Consroe, 1998; Ferrer et al. 2007). En estudios con humanos, las puntuaciones de *craving* hacia el alcohol correlacionaban con las concentraciones elevadas de AEA en bebedores sin TUS, por lo que la sugiere como biomarcador periférico de la regulación del deseo de beber (Mangieri et al., 2009).

A parte de lo que hemos descrito de la AEA por su función integrada en el SEC, se sabe que el alcohol produce aumento de las concentraciones de AEA en el sistema límbico y NAc en ratas (González et al., 2002; Malinen et al, 2009) y disminuciones en la amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (Malinen et al., 2009; Rubio et al., 2007).

Figura 14: Efectos en los niveles plasmáticos de la administración aguda de etanol (a) y OEA (b) en ratas



Efectos de la administración aguda de etanol (4g/kg, i.p.) sobre los niveles plasmáticos de etanol y OEA. Se midieron las concentraciones de etanol a 0, 45, 90 y 240 minutos en niveles plasmáticos de etanol (a) y OEA (b). **p>0,001; ***p>0,001 muestran diferencias significativas con el grupo de tiempo cero.

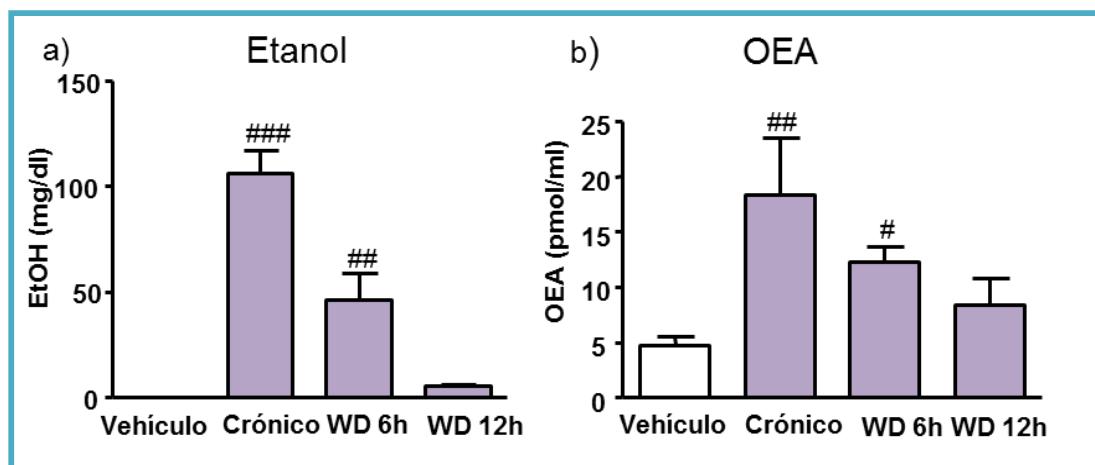
Fuente: Bilbao et al., 2016

Además de la AEA, recientemente hemos descrito un papel de la OEA en los comportamientos asociados al consumo de alcohol utilizando un model animal. En la Figura 14, se puede observar el efecto de la administración aguda de alcohol sobre los niveles plasmáticos de alcohol y OEA. Se aprecia un incremento significativo de éste a los 45, 90 y 240 minutos y niveles de OEA significativamente aumentados a los 90 y a los 240 minutos. La administración de alcohol está asociada con un incremento en la producción de OEA y esto contribuye a la regulación de diferentes efectos comportamentales, incluyendo una disminución en el consumo y también una reducción de la severidad de los síntomas de abstinencia (Bilbao et al., 2016).

El efecto de la OEA sobre la reducción del consumo de alcohol, está mediada por el receptor periférico PPAR- α . Además se ha comprobado que la coadministración de un antagonista de PPAR- α (el receptor GW6471) anula la reducción del consumo de alcohol.

Al igual que el tratamiento agudo, la exposición crónica al alcohol y la abstinencia también afectan a los niveles de OEA. Las ratas expuestas a una dieta líquida de alcohol durante 21 días muestran un incremento en las concentraciones plasmáticas de OEA, incremento que va decayendo con el transcurso de la abstinencia (ver Figura 15) hasta normalizarse los niveles de alcohol en sangre.

Figura 15: Efectos en los niveles plasmáticos de la administración crónica de etanol (a) y OEA (b) en ratas

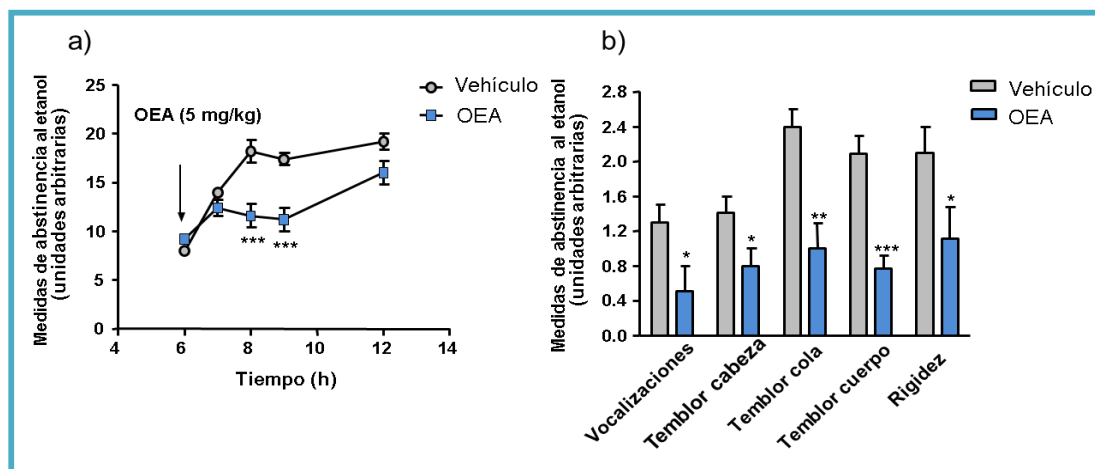


Efectos de una exposición a dieta líquida con etanol de 21 días seguida de un periodo de abstinencia (medido a las 6 y 12 horas tras el cese de la dieta líquida de etanol) sobre los niveles plasmáticos de etanol (a) y OEA (b). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ muestran diferencias significativas con el grupo vehículo. WD=abstinencia

Fuente: Bilbao et al., 2016

La disminución en la concentración de OEA en plasma coincide con el inicio de los síntomas propios del síndrome de abstinencia. De hecho, la administración de OEA al inicio de la abstinencia produce una disminución en la severidad de los síntomas físicos a las 8-9 horas de la inyección (Figura 16) (Bilbao et al., 2016).

Figura 16: Efectos de la OEA sobre el síndrome de privación alcohólica, en medidas generales de abstinencia (a) y en cada síntoma aislado (b)



Efectos de la OEA en los síntomas de abstinencia al etanol. La administración aguda de OEA reduce las puntuaciones globales medidas entre las 6 y las 12 horas de abstinencia (a). Este efecto se observa en cada síntoma evaluado (b). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ muestran diferencias significativas con el grupo vehículo.

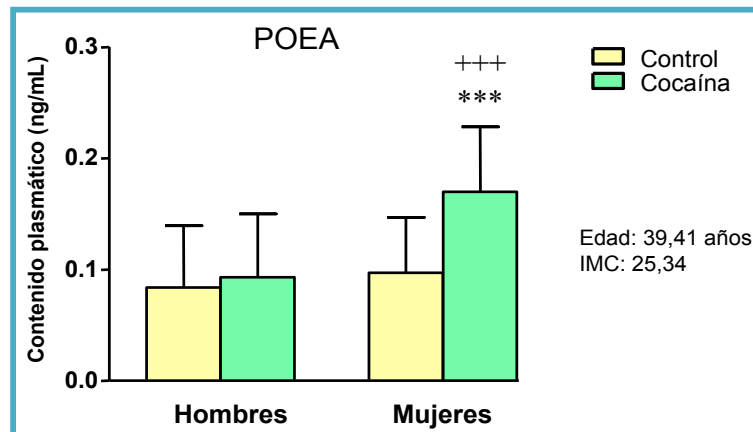
Fuente: Bilbao et al., 2016

Existen estudios clínicos que también han evaluado y relacionado el perfil plasmático de aciletanolamidas y congéneres en sujetos con TUS, concretamente se ha estudiado el perfil plasmático de AEA en pacientes con esquizofrenia y TUS (Potvin et al., 2008; Desfossés et al., 2012). Además, estudios en pacientes en abstinencia de cocaína han demostrado que las aciletanolamidas son buenos predictores del consumo de esta sustancia, especialmente la DGLEA (Pavón et al., 2013).

En los estudios clínicos es importante el estudio de dimorfismo sexual, de suma importancia ante biomarcadores específicos de sexo, como la POEA (Pedraz et al., 2015). En la Figura 17 se muestran las diferencias por el género encontradas en esta aciletanolamida, en una población de pacientes con trastornos por uso de cocaína en abstinencia en comparación con el grupo control, donde las pacientes mujeres tenían las concentraciones alteradas en comparación con el grupo control mujer y el grupo cocaína hombre.

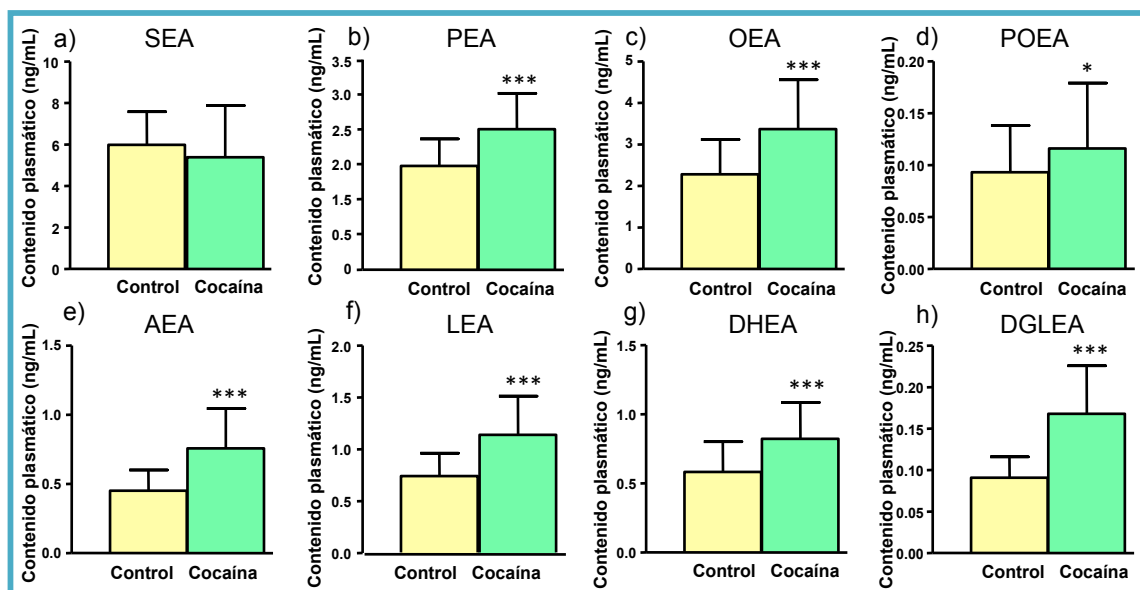
Además, el estudio realizado por nuestro grupo, en el que se miden aciletanolamidas en consumidores de cocaína en abstinencia, encuentra que las concentraciones plasmáticas de determinadas aciletanolamidas (LEA, POEA, PEA, DHEA, AEA, OEA, AEA y DGLEA) están aumentadas en sujetos con trastornos por uso de cocaína según el historial de consumo en comparación con sujetos control (Figura 18).

Figura 17: Niveles plasmáticos de POEA en mujeres y hombres diagnosticados de trastornos por uso de cocaína



Concentraciones plasmáticas de POEA en sujetos con trastornos por uso de cocaína y sujetos control agrupados por edad. (***) $p < 0,001$ muestra diferencias significativas con el control hombre o control mujer respectivo (+++) $p < 0,001$ muestra diferencias significativas con el grupo de hombres de cocaína
Fuente: Pedraz et al., 2015

Figura 18: Niveles plasmáticos de aciletanolamidas en sujetos con trastornos por uso de cocaína abstinentes y sujetos control



Niveles plasmáticos de aciletanolamidas en sujetos con trastornos por uso de cocaína y sujetos control. Niveles SEA (a); PEA (b); OEA (c); POEA (d); AEA (e); LEA (f); DHEA (g) y DGLEA(i). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ muestran diferencias significativas con el grupo control
Fuente: Pavón et al., 2013

También, en este mismo estudio se vio una alteración de las concentraciones plasmáticas de OEA, en pacientes con comorbilidad psiquiátrica en trastornos del estado de ánimo y trastornos de ansiedad (Pavón et al., 2013).

Específicamente y con respecto al alcohol que es la sustancia que nos ocupa, también se han estudiado los niveles plasmáticos de AEA como marcadores de deseo en bebedores en abstinencia (Mangieri et al., 2009).

1.5.4.Quimioquinas

Las quimioquinas son un tipo de citoquinas quimio-atrayentes pertenecientes al sistema inmunológico, y tienen la capacidad de inducir quimiotaxis en las inmediaciones de las células sensibles. Presentan una serie de características estructurales comunes, tales como su pequeño tamaño o la presencia de cuatro residuos de cisteína en regiones protegidas, las cuales son clave para la construcción de su estructura tridimensional.

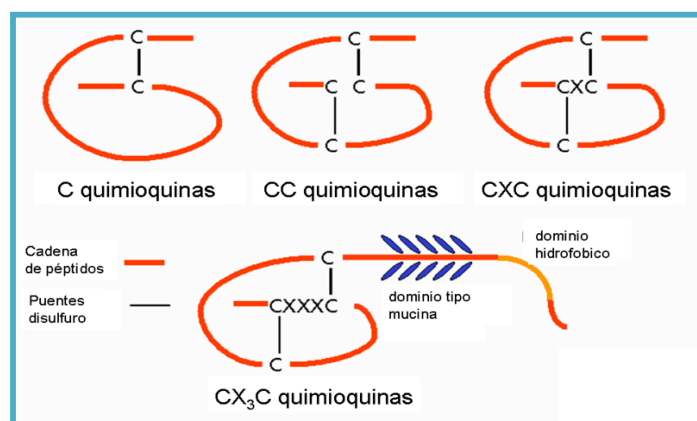
Las quimioquinas se pueden dividir en cuatro grupos dependiendo de la distancia entre los dos primeros residuos de cisteína. En la Figura 19 se recogen las diferencias estructurales esquemáticamente entre ellas:

Ligandos CC (CCL) (o β -quimioquinas) tienen dos cisteínas cerca de su extremo amino terminal. Contienen normalmente seis cisteínas, e inducen la migración de monocitos y células dendríticas en los mamíferos. Las quimioquinas tipo CC que vamos a estudiar son, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) y la CCL11 (Eotaxina):

- ♦ **CCL2 o MCP-1** es un biomarcador candidato en la predicción de tasas de enfermedad de Alzheimer en fase prodrómica (Westin et al., 2012). En experimentos animales, se ha visto que MCP-1 es capaz de modular la actividad neuronal en la sustancia negra, liberando dopamina y aumentando excitabilidad y actividad motora (Guyon et al., 2009).
- ♦ **CCL11 o Eotaxina-1** es una de las quimioquinas estudiadas más importantes, es un ligando de CCR3, un receptor con preferencia por linfocitos TH2. Además, tiene un potente efecto quimioatrayente en los eosinófilos, acumulándose ante la inflamación alérgica (Targowski et al., 2005; Magalhaes, 2014) y juega un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades como el asma (Wu et al., 2014). En modelos animales, es una molécula que se relaciona con una reducción de la neurogénesis en el hipocampo, y con la disminución del aprendizaje en la edad avanzada (Villeda et al., 2011). Se han visto alteraciones en concentraciones de eotaxina-1 en pacientes con esquizofrenia al compararlos con controles sanos (Panizzutti, et al., 2015; Teixeira et al., 2008).

Quimioquinas C (o quimioquinas γ) que atraen a los precursores de las células T al timo. Se han descubierto dos quimioquinas que pertenezcan a este subgrupo, y se llaman XCL1 y XCL2.

Figura 19: Estructura de las diferentes clases de quimioquinas. Adaptado de Kohidai, 2008



Quimioquinas CXC (o α -quimioquinas) tienen dos cisteínas N terminales de CXC y están separadas por un aminoácido, representado con una X. Se han descubierto 17 quimioquinas CXC en mamíferos, que se subdividen en dos categorías, aquellos con una secuencia específica de aminoácidos (o motivo) de ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) inmediatamente antes de la primera cisteína del motivo CXC (ELR-positivo), y los que no tienen un motivo ELR (ELR-negativo). Las quimioquinas tipo CXC que vamos a estudiar son, la interleukina 8 (CXCL8 o IL-8) y el ligando 12 CXCL12 (o el derivado de células estromales SDF-1).

- ♦ **IL-8** es una quimioquina producida por monocitos, macrófagos y células endoteliales (Barbosa et al., 2013) que induce la trans migración y la desgranulación de los neutrófilos (Semple et al., 2010). Además, los cambios periféricos de IL-8 se han asociados a trastornos autoinmunes y esquizofrenia (Ellman et al., 2010; Zhang et al., 2004).
- ♦ **CXCL12 o SDF-1** se expresa en neuronas colinérgicas, dopaminérgicas y vasopresinérgicas (Banisadr et al., 2003) y en estudios electrofisiológicos en células Purkinje cerebelares, hipocampo e hipotálamo modulando la actividad simpática en la membrana neuronal (Skrzydelski et al., 2007).

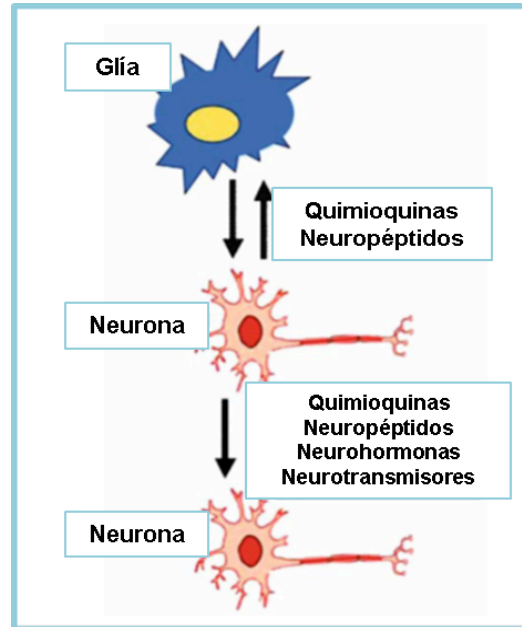
Quimioquinas CX₃C cuyos miembros presentan tres aminoácidos entre las dos cisteínas. Es a la vez secretada y atada a la superficie de la célula que lo expresa, por lo que sirve tanto como un quimioatrayente como una molécula de adhesión. De las quimioquinas tipo CX₃C la única que se ha descubierto hasta ahora y que vamos a estudiar es la CX₃CL1 o fractalquina.

- ♦ **CX₃CL1 o Fractalquina** está involucrada en la proliferación celular del hipocampo y en procesos inflamatorios en trastornos mentales como la depresión, el trastorno bipolar, la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (Stuart & Baune, 2014) y en la consolidación del fenotipo adicto (Mandyam & Koob, 2012). También se puede considerar a la fractalquina como un marcador útil en la severidad en la pancreatitis alcohólica crónica (Yasuda et al., 2008).

Las quimioquinas se acoplan a receptores de proteínas G con siete dominios transmembrana que se encuentran en la superficie de los leucocitos. Se han descubierto diecinueve receptores distintos, que se dividen en cuatro familias dependiendo del tipo de quimioquinas que se unen a ellos. Los receptores CXCR se unen a quimioquinas CXC, los receptores CCR se unen a quimioquinas CC, los CX3CR1 se unen a la única quimioquina CX3C (CX3CL1), y el receptor XCR1 se une a las dos quimioquinas XC (XCL1 y XCL2).

Las quimioquinas modulan comportamientos mediante acciones específicas en la señalización inflamatoria, tanto a nivel plasmático, actuando como marcadores de riesgo cardiovascular regulando procesos de envejecimiento arterial (Larsson et al., 2015), como a nivel cerebral (Salim et al., 2012). Actúan conjuntamente con neurotransmisores y sistemas de neuropéptidos y puede alterar las acciones de agentes farmacológicos como los opioides y cannabinoides e interactuar con los sistemas de neurotransmisión cerebral (Adler et al., 2008).

Figura 20: Vías de comunicación en el SNC.
Adaptado de Adler et al., 2008



Entre las funciones más conocidas de las quimioquinas encontramos el desarrollo neuronal, la maduración, supervivencia y la regeneración del SNC (Crews et al., 2011).

La evidencia indica que las quimioquinas cerebrales juegan un papel homeostático ante situaciones de inflamación. El sistema glial produce y libera quimioquinas por distintas vías de comunicación: sistema neurona a neurona, glía a neurona y neurona a glía (Adler et al., 2008). Las vías de comunicación de las quimioquinas aparecen reflejadas en la Figura 20.

La inflamación es un proceso fundamental en la etiopatogenia de trastornos neuropsiquiátricos que afecta a mecanismos celulares y moleculares, aunque también se producen cambios en la expresión de receptores y migración celular debido al envejecimiento normal (Harry, 2013). La intervención de las citoquinas afecta a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, al daño miélinico, a la apoptosis neuronal y de oligodendrocitos (Borsini et al., 2014).

El dimorfismo sexual que se produce en los procesos de neuroinflamación se ha relacionado con el riesgo, progreso y recuperación de algunos trastornos neurológicos, por ello hay que tener cautela al sacar conclusiones por parte de los cambios que se ven en estas quimioquinas, sobre todo en variables biológicas relacionadas, como la edad y el sexo (Targowski et al., 2005). Los estrógenos modulan la acción anti-inflamatoria mediante una actividad protectora sobre el

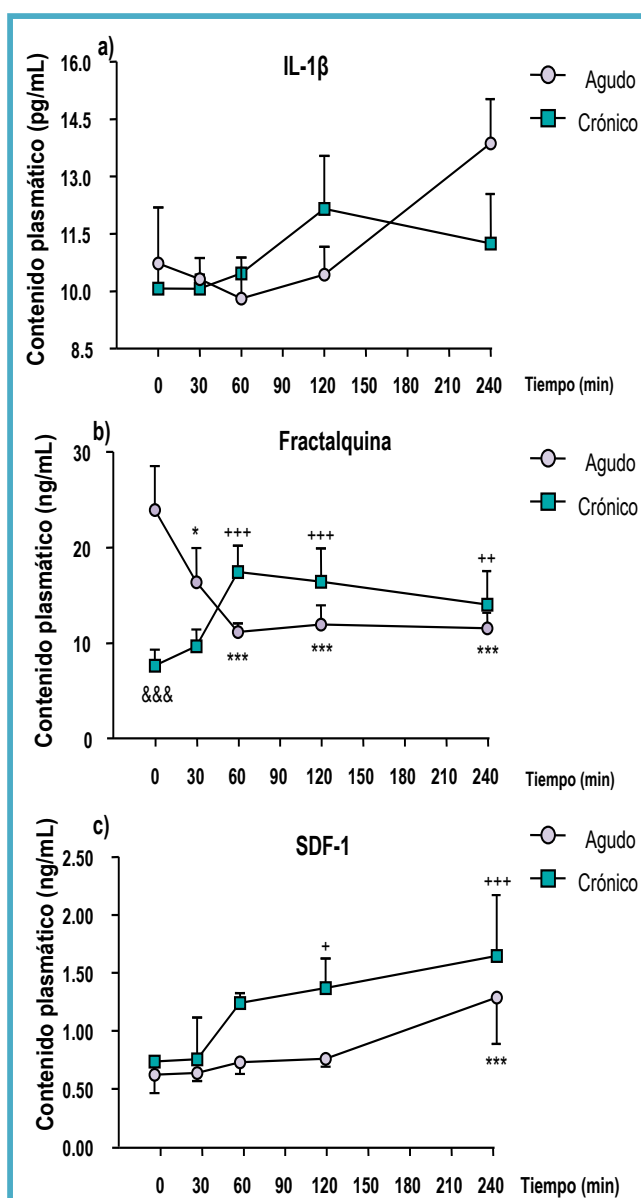
SNC y pueden ser la causa de las diferencias entre hombres y mujeres en las acciones anti-inflamatorias de las quimioquinas (Czlonkowska et al., 2006).

Las variaciones causadas por el sistema inmune en otros sistemas como el glucocorticoide, pueden influir en procesos afectivos como la depresión mayor (Carvalho et al., 2014) y hay autores que presentan a las quimioquinas como buenos biomarcadores psicopatológicos (Stuart & Baune, 2014) ya que la desregulación de las señales mediada por la neuroinflamación y su acción, pueden contribuir a la aparición de trastornos mentales como los trastornos del estado de ánimo, ansiedad generalizada, los trastornos de personalidad (Magalhaes et al., 2014; Salim et al., 2012; Ogłodek et al., 2014, 2015) o en la fisiopatología del trastorno bipolar (Barbosa et al., 2013; Panizzutti, 2015).

1.5.4.1. Papel de las quimioquinas en adicciones

El consumo de cocaína afecta tanto a marcadores homeostáticos como a inflamatorios y la administración repetida de cocaína induce un descenso significativo en el número de leucocitos y linfocitos (Jankowski et al. 2010) alterando la función de células T, *natural killers*, neutrófilos y macrófagos, afectando a su capacidad de secretar citoquinas inmunorreguladoras (Baldwin et al., 1998).

Figura 21: Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios de IL-1 β (a), Fractalquina (b), SDF-1 (c) en tratamiento con cocaína agudo y crónico

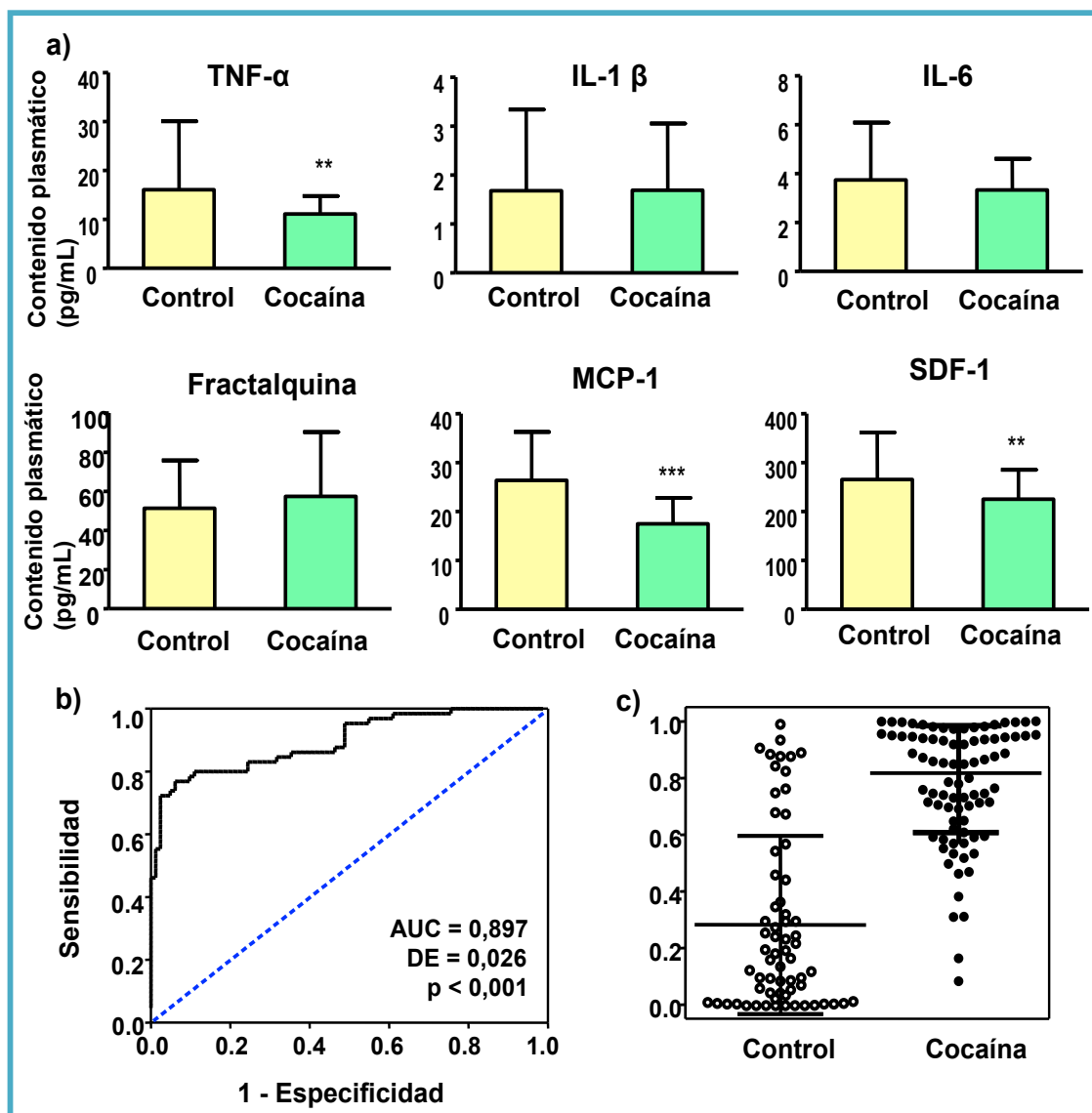


Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios en ratones tratados con cocaína de forma aguda (25 mg/kg, i.p.) o con tratamiento crónico (dosis diaria de 25 mg/kg i.p.) en IL-1 β (a), Fractalquina (b), y SDF-1 (c). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ muestra diferencias significativas con el tiempo 0. ** $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ muestra diferencias significativas entre tiempo 0 y tratamiento crónico. &&& $p < 0,001$ muestra diferencias significativas entre tratamiento agudo y tratamiento crónico a tiempo 0

Fuente: Araos et al., 2015

Un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo de investigación describe el perfil plasmático de determinadas quimioquinas y citoquinas en pacientes adictos a cocaína así como en modelos animales (Araos et al., 2015). En este estudio se muestra una relación entre los trastornos por uso de cocaína y las alteraciones plasmáticas de estas quimioquinas/citoquinas. En el modelo animal, se encuentra que los niveles de Interleukina 1beta (IL-1 β), fractalquina y SDF-1 están afectados por la administración tanto aguda como crónica de cocaína (Figura 21) (Araos et al., 2015).

Figura 22: Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios en sujetos con trastornos por uso de cocaína y sujetos control (a) y curva ROC generada por un modelo logístico (b)



Niveles plasmáticos de mediadores pro-inflamatorios en sujetos con trastorno por uso de cocaína en abstinencia en un análisis de curvas ROC de modelos logísticos en el uso patológico de la cocaína. Niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios TNF- α , IL- β , IL-6, Fractalquina, MCP-1 y SDF-1(a), curva ROC generada por un modelo logístico (b) y puntos de dispersión con las probabilidades predictivas del grupo cocaína y del grupo control (c). **p<0,01 y ***p<0,001 muestran diferencias significativas con el grupo control. AUC=área bajo la curva, DE= desviación estándar.

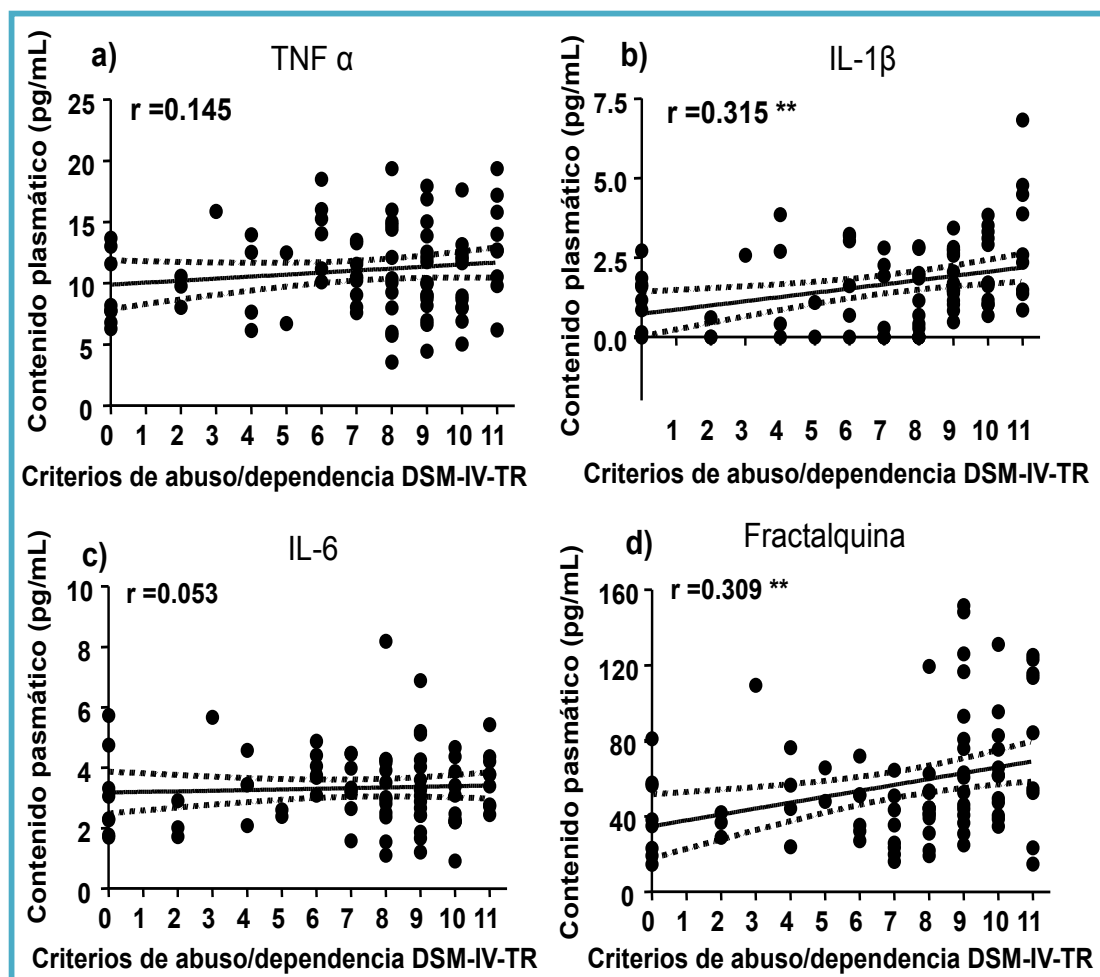
Fuente: Araos et al., 2015

En este mismo estudio clínico, tras realizar un análisis de curvas ROC, se identifican tres mediadores pro-inflamatorios [TNF- α (factor de necrosis tumoral tipo α), MCP-1 y SDF-1] como predictores del consumo patológico de cocaína (ver Figura 22).

Además, (como se ve en la Figura 23) en estos pacientes con trastornos por uso de cocaína en abstinencia, los niveles de algunas quimioquinas [IL-1 β , fractalquina y SDF-1] se alteran en relación a la gravedad de la sintomatología de la adicción,

distinguiendo entre pacientes con una cantidad de criterios leve o moderada y pacientes con una suma elevada de criterios según DSM-IV TR en la muestra del estudio (Araos et al., 2015).

Figura 23: Análisis de correlación entre mediadores pro-inflamatorios y número de criterios de adicción según el DSM-IV-TR



Análisis de correlación entre niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios y número total de criterios de abuso y dependencia según el manual estadístico (DSM-IV-TR) en TNF- α (a), IL- β (b), IL-6, (c), Fractalkina (d), MCP-1 (e), SDF-1. Los puntos son valores individuales. Se realizaron coeficientes de correlación de Pearson (r) para cada proteína. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ muestran correlaciones significativas
Fuente: Araos et al., 2015

Se sabe que cuando aparecen trastornos de ansiedad, se produce una respuesta inmune innata. Esta respuesta aparece igual ante el consumo de alcohol y ante cualquier comportamiento que dañe al cerebro (Mayfield et al., 2013) y la exposición continuada de alcohol impacta en la señalización inmune debido a la neurotoxicidad que produce (Coller & Hutchinson, 2012).

La experimentación con animales demuestra que el abuso de alcohol induce mediadores inflamatorios que causan daño cerebral (Alfonso-Loeches et al., 2010; Vallés et al., 2004) y en humanos, el riesgo de padecer un TUA se atribuye al efecto

de polimorfismos en los genes innatos pero también a la pérdida de flexibilidad en la señalización inmune de la corteza prefrontal (Coller & Hutchinson, 2012)

Estudios anteriores han visto que la quimioquina MCP-1 (CCL2) es una molécula de señalización que promueve comportamientos adictivos en animales (Guyon et al., 2009; Kane et al., 2014; Trecki & Unterwald, 2009) así como en pacientes con problemas derivados del alcohol (He & Crews, 2008; Umhau et al., 2014).

La neuropatología inducida por los efectos del alcohol es resultado de respuestas multicelulares en las células de la microglia (Gofman et al., 2014) por lo que también se ha estudiado mucho la expresión de quimioquinas en el hígado de pacientes con enfermedades hepáticas inducidas por alcohol (Gao & Bataller, 2011; Hayashi & Sakai, 2011). Ciertas quimioquinas (IL-8, MCP-1 y MIP-1 α) desempeñan un papel crucial en las distintas respuestas inflamatorias causadas por alcohol (Afford et al., 1988) y de ellas, la IL-8 se relaciona con procesos digestivos y con el diagnóstico de hepatitis inducida por alcohol (Świątkowska-Stodulska et al., 2006).

Pese a todo lo que se sabe hasta ahora del funcionamiento de las citoquinas y quimioquinas en el sistema inmunitario a nivel cerebral y su relación con los TUA y otros trastornos psiquiátricos, se necesita precaución a la hora de relacionar posibles cambios debido a un amplio rango de actividades biológicas en las que participan estos mediadores pro-inflamatorios, ya que estos cambios pueden variar a través del tiempo (González-Quintela et al., 2000).

2. Hipótesis y objetivos

La adicción es un trastorno crónico y recidivante que afecta a todos los ámbitos del individuo, desde la alteración de vías metabólicas y de comunicación celular, hasta las neuroadaptaciones producida a través de las modificaciones dentro del sistema de refuerzo y recompensa manifestos a través del comportamiento y malestar clínico. Este trabajo parte de la premisa de que existen moléculas circulantes que intervienen en procesos cerebrales relacionados con la comunicación celular y que regulan procesos básicos relacionados con el fenotipo del paciente que sufre trastorno por uso de alcohol.

2.1. Hipótesis general de la tesis

La hipótesis general de esta tesis sería que ***“El trastorno por uso de alcohol induce cambios en moléculas bioactivas plasmáticas en sujetos con historial de consumo a largo plazo, y que presentan comorbilidad psiquiátrica asociada, por lo que servirían de biomarcadores de enfermedad”.***

Hay evidencias de que determinadas alteraciones moleculares en adicción y otros trastornos psiquiátricos se identifican como potenciales marcadores biológicos de fenómenos asociados a la adicción a cocaína (gravedad de la adicción, duración de la abstinencia, tiempo de consumo problemático) y a comorbilidad psiquiátrica (Araos et al., 2015; Pavón et al., 2013). Desde un enfoque bio-psico-inmunológico se busca comprender los distintos cambios que se van produciendo en el organismo debido a la adicción al alcohol, y por ello vamos a abordar el estudio de estas moléculas (monoacilgliceroles, aciletanolamidas y quimioquinas) en relación al abuso y dependencia del alcohol a la vez que se registran los criterios comportamentales y físicos que causa este tipo de enfermedad.

Esta hipótesis general se aborda en tres estudios científicos cuyas hipótesis experimentales son:

2.1.1. Hipótesis estudio I

H1. Los trastornos por uso de alcohol presentarán una elevada comorbilidad psiquiátrica tanto en trastornos por uso de otras sustancias como en trastornos mentales.

H2. Los trastornos por uso de alcohol mostrarán diferencias en las variables relacionadas con el uso de alcohol entre hombres y mujeres.

H3. Los monoacilgliceroles circulantes serán predictores objetivos de trastornos por uso de alcohol y de trastornos psiquiátricos comórbidos.

2.1.2. Hipótesis estudio II

H1. Sujetos diagnosticados con trastornos por uso de alcohol presentarán alteraciones en los niveles plasmáticos de aciletanolamidas.

H2. Las alteraciones en las concentraciones plasmáticas de estos derivados lipídicos podrán relacionarse con variables asociadas a los trastornos por uso de alcohol (duración del consumo problemático, tiempo de abstinencia, gravedad del trastorno, etc.).

H3. Las alteraciones en las concentraciones plasmáticas de estos derivados lipídicos se relacionarán con el diagnóstico y la prevalencia de comorbilidad psiquiátrica, incluyendo trastornos comórbidos por uso de otras sustancias y otros trastornos psiquiátricos no relacionados con sustancias de abuso (trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, psicóticos, etc.).

2.1.3. Hipótesis estudio III

H1. Sujetos diagnosticados con trastornos por uso de alcohol tendrán alteraciones en los niveles plasmáticos de quimioquinas.

H2. Alteraciones de señales inflamatorias inducidas por el consumo de alcohol permitirán proponerlas como biomarcadores de consumo.

H3. El consumo de alcohol presenta una elevada comorbilidad psiquiátrica. Por lo tanto, biomarcadores inflamatorios asociados al consumo podrán actuar como predictores de trastornos psiquiátricos comórbidos.

2.2. Objetivo general de la tesis

Esta tesis tiene como objetivo general el estudio de algunos de los procesos subyacentes a la adicción al alcohol, reflejados en la aparición de cambios en las concentraciones plasmáticas de moléculas bioactivas relacionadas con procesos emocionales, motivacionales, inflamatorios y regenerativos. La finalidad de este estudio es conseguir una mejora de los diagnósticos y tratamientos que existen actualmente en los trastornos por uso de alcohol, a partir de una correcta estratificación y caracterización del sujeto dependiente a esta sustancia.

Los diferentes estudios se realizan en una cohorte de sujetos con trastorno por uso de alcohol en abstinencia en tratamiento ambulatorio.

01. Reclutamiento de una muestra de sujetos con diagnósticos de trastornos por uso de alcohol en tratamiento ambulatorio en abstinencia y sujetos controles pareados por edad, sexo e índice de masa corporal que cumplan los criterios de participación en el estudio.

02. Recogida de datos sociodemográficos y evaluación psiquiátrica de todos los participantes mediante entrevistas semiestructuradas de evaluación clínica para población con trastornos por uso de sustancias para la fenotipación de variables clínicas y de comorbilidad.

03. Determinación de las concentraciones plasmáticas de monoacilglicerol, aciletanolamidas y quimioquinas en muestras de pacientes en abstinencia por tratamiento de trastornos por uso de alcohol y sujetos control.

2.2.1. Objetivo específico estudio I

Determinación de las concentraciones plasmáticas de determinados monoacilglicerol (2-AG, 2-LG y 2-OG) en muestras de sujetos diagnosticados con trastornos por uso de alcohol y sujetos control.

2.2.2. Objetivo específico estudio II

Determinación de las concentraciones plasmáticas de determinadas aciletanolamidas (OEA, AEA, DEA, PEA, SEA, LEA, POEA, DGLEA y DHEA) en muestras de sujetos diagnosticados con trastornos por uso de alcohol y sujetos control.

2.2.3. Objetivo específico estudio III

Determinación de las concentraciones plasmáticas de determinadas quimioquinas (citoquinas quimioatrayentes) [CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL11 (Eotaxina-1), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1) y CX3CL1 (Fractalquina)] en muestras de sujetos en abstinencia por tratamiento de trastornos por uso de alcohol y sujetos control.

04. Analizar los datos con diferentes aproximaciones estadísticas para identificar las relaciones existentes entre las variaciones plasmáticas de estas sustancias y el fenotipo clínico de los pacientes con trastornos por uso de alcohol, para establecer su posible valor como biomarcadores de adicción y comorbilidad psiquiátrica.

3. Metodología

3.1. Diseño general de los experimentos

3.1.1. Diseño clínico

El marco metodológico de esta tesis se basa en el estudio exploratorio y transversal de una población de pacientes que acuden a tratamiento ambulatorio en un centro asistencial hospitalario por su trastorno por uso de alcohol. Los pacientes son de ambos sexos y se estudian en abstinencia. La exploración y caracterización de esta población se llevó a cabo mediante su comparación con una muestra de sujetos que componen el grupo control (sin trastornos por uso de sustancias) reclutados entre el personal sanitario de las instituciones participantes. Todos los datos de los estudios realizados con estas dos poblaciones (alcohol y control) se recogen a partir de entrevistas de evaluación psiquiátrica y a través de la determinación plasmática de potenciales marcadores biológicos que están relacionados con los trastornos por uso de alcohol y comorbilidad psiquiátrica.

Figura 24: Esquema del procedimiento del diseño experimental

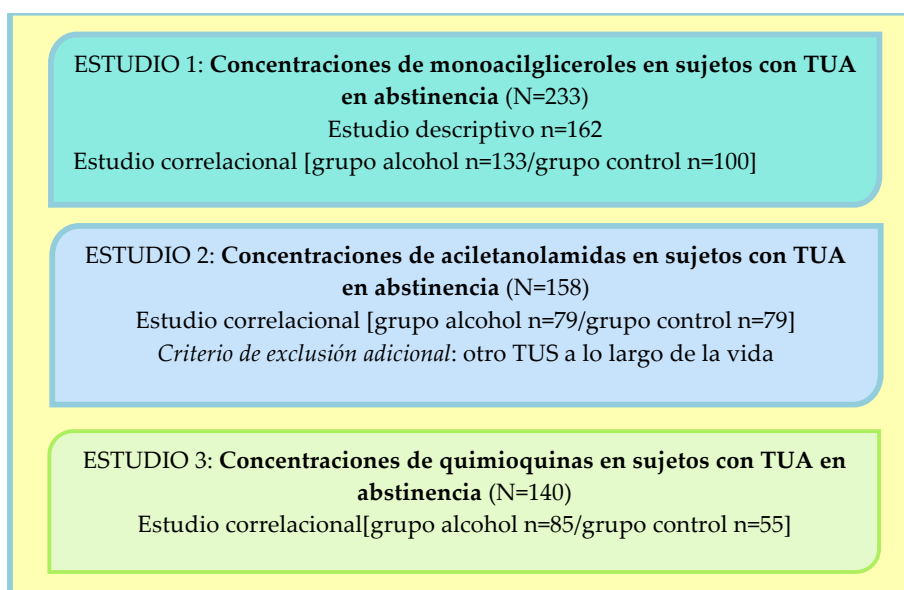


3.1.1.1. Descripción de los distintos estudios

La población participante en este trabajo estaba formada por sujetos de ambos sexos, de raza blanca caucásica, distribuidos en dos grupos en función de la existencia de un historial de trastornos por uso de alcohol: 1) Una muestra de pacientes en abstinencia de alcohol procedentes del área de psiquiatría del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid 2) Un grupo control de sujetos voluntarios pertenecientes en su mayoría al personal asistencial de los centros hospitalarios participantes, y que no tenía historial de trastornos por uso de alcohol u otras sustancias. Los controles fueron seleccionados para obtener una población equilibrada en cuanto a la edad, índice de masa corporal (IMC) y ratio de sexo del grupo alcohol.

El número de participación en cada estudio estaba supeditado al análisis de moléculas plasmáticas enviadas en cada fase a los distintos laboratorios. Para ello se emplearon los criterios de participación generales anteriormente descritos, y de forma específica se añadieron criterios según el estudio. Los criterios aparecen resumidos en la Figura 25.

Figura 25: Descripción de la población de cada estudio y criterios específicos de cada estudio



3.1.1.2. Criterios de participación

El reclutamiento de la población para los tres estudios diferentes se basó en el cumplimiento de una serie de criterios de participación. Todos los participantes eran mayores de edad, con una edad comprendida entre 18 a 65 años, y habían accedido a participar de forma voluntaria y anónima a través de la firma de los consentimientos informados pertinentes. Existen algunas diferencias entre los diferentes estudios respecto a los criterios de inclusión y exclusión, que se especifican en cada caso. A continuación se especifican los criterios de inclusión específicos de cada grupo de participación:

Criterios de inclusión del grupo alcohol

Los participantes incluidos en el grupo alcohol, debían haber sido diagnosticados por un TUA (abuso y/o dependencia). Todos los participantes se encontraban en tratamiento ambulatorio en un programa de deshabituación guiada, y participación en terapias grupales psicoeducativas. La sustancia principal por la que los pacientes habían acudido a tratamiento debía haber sido el alcohol, a pesar de que podía haber otras sustancias de consumo o problemática asociada. El diagnóstico de TUA fue determinado mediante una entrevista personal de evaluación psiquiátrica individualizada basada en criterios DSM-IV-TR y corroborados por historial médico del paciente. Los pacientes debían estar en abstinencia al menos 4 semanas previas a la extracción de muestra biológica. La monitorización de la abstinencia se realizaba en enfermería las primeras semanas con la toma ambulatoria de la medicación en presencia de los sanitarios, y a través de un alcoholímetro antes de realizar la analítica para comprobar que el contenido de alcohol en el aire espirado fuese 0 g/L en el momento de la extracción.

Criterios de inclusión de los controles

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la participación de los sujetos controles fueron los siguientes: no haber tenido diagnóstico de trastornos por uso de sustancias a lo largo de su vida ni historial de comorbilidad psiquiátrica concomitante. Que su elección en el estudio fuese porque se podían parear en edad, IMC y sexo con el grupo de participantes casos.

Criterios de exclusión para ambos grupos

Los criterios de exclusión que se tuvieron en cuenta para la participación en el estudio para los pacientes en abstinencia del grupo alcohol y grupo control fueron los siguientes:

- La ausencia de enfermedades infecciosas. Este criterio se comprobó a través de pruebas de rápida detección en plasma para VIH, hepatitis B y C. En cada caso positivo, la muestra de sangre se elimina siguiendo un protocolo de seguridad de laboratorio para minimizar los riesgos de infección del personal sanitario e investigador.
- La presencia de alteraciones cognitivas que dificultasen la aplicación de los instrumentos de evaluación diagnóstica (este criterio se incluyó durante la realización del estudio) y el rechazo de participación por parte del paciente o del control. En el caso de participantes mujeres, se excluyen en el estudio mujeres embarazadas, para evitar la alteración de parámetros biológicos.

Un criterio de exclusión exclusivo del Estudio 2 fue la presencia criterios de abuso y/o dependencia a otras sustancias, para descartar la influencia de otras sustancias en las mediciones de aciletanolamidas, debido a la elevada comorbilidad de trastornos de uso por otras sustancias encontrada en el estudio descriptivo de la población en el Estudio 1. Por tanto, en el Estudio 2, solo se seleccionaron pacientes con TUA.

3.1.2. Diseño animal

Para la valoración traslacional de las acciones del alcohol sobre alguno de los biomarcadores seleccionados en los estudios humanos, se llevaron a cabo estudios con ratas Wistar macho (Laboratorio Charles River España S.A., Barcelona, España) de 5 a 8 semanas de edad con un peso de 200-250 g al comienzo de los experimentos. Las ratas se mantuvieron en jaulas transparente bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luces apagadas a las 20:00h) en una habitación con una temperatura ambiente de 23º y 55% de humedad en el Centro de Recursos Animales de la Universidad de Málaga (España). El Agua y el pienso estaban disponibles durante todo el curso de estos estudios. La exposición a alcohol se realizó según los protocolos descritos en los estudios adjuntos.

3.2. Aspectos éticos

3.2.1. Aspectos éticos de los estudios clínicos

Todos los participantes fueron informados mediante una descripción completa de los estudios antes de la realización de la entrevista clínica y de la extracción de la sangre. Los pacientes, eran informados por los sanitarios del programa de deshabituación de alcohol, y de esta forma se firmaba el consentimiento informado una vez que el paciente decidía participar. De forma similar, se informaba a los participantes del grupo control, que fueron reclutados de forma aleatoria entre el personal del Hospital Regional Universitario de Málaga, Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y personal de la Universidad Complutense de Madrid.

Los aspectos éticos del presente estudio fueron aprobados por el comité de ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. El protocolo de reclutamiento fue aprobado por el comité ético del Hospital Regional Universitario de Málaga de acuerdo con los principios éticos de investigación en humanos aprobados en la Declaración de Helsinki por la Asociación Médica Mundial. Este estudio está enmarcado en el programa “Consecuencias médicas del alcoholismo” perteneciente a la Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III”.

3.2.2. Aspectos éticos del estudio experimental

Los experimentos y procedimientos se llevaron a cabo bajo una estricta adherencia a la Directiva Europea 2010/63/EU9 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y de la normativa española (RD 53/2013 y 178/2004). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento innecesario y reducir el número de animales utilizados. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

3.3. Evaluación clínica

En los estudios clínicos se realizó la evaluación minuciosa de cada paciente de estudio mediante herramientas de evaluación clínica, realizada por un psicólogo sanitario general con formación especializada y acreditada en evaluación psicopatológica. Se realizó el mismo procedimiento de evaluación para el grupo control, pero la entrevista se llevó a cabo en un formato de cribado diagnóstico.

Todos los participantes del estudio fueron evaluados de acuerdo a criterios DSM-IV-TR, mediante la utilización como instrumento principal de la versión española de la *Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases* (PRISM) (Hasin et al., 1996; Torrens et al., 2004). Este instrumento es una entrevista semiestructurada, con cualidades psicométricas en términos de fiabilidad test-retest (Hasin et al., 2006), fiabilidad entre distintos evaluadores (Morguello et al., 2006) y validez (Torrens et al., 2004) para el diagnóstico de trastornos psiquiátricos en consumidores de sustancias de abuso que permite diferenciar los trastornos mentales primarios de los trastornos inducidos por sustancias y de los efectos esperados de la intoxicación y de la abstinencia. Aunque durante el transcurso de la Tesis Doctoral surgió un nuevo acuerdo diagnóstico de las enfermedades mentales (DSM-V), el instrumento PRISM no se había adaptado y validado a esta clasificación por lo que todos los estudios se publicaron adheridos al manual DSM-IV TR.

Trastornos mentales primarios

Los trastornos están constituidos por una constelación de síntomas, el sujeto debe cumplir un número determinado de síntomas para poder hacer el diagnóstico. Se evalúa el deterioro o el malestar y el curso de los síntomas, así como sobre la remisión de la sintomatología, y sobre todo el momento en el que empezó y finalizó el episodio más reciente del trastorno. Se diagnostica un trastorno mental primario cuando el episodio se produce durante un período de abstinencia o con el consumo ocasional de la sustancia, por lo que una parte importante del episodio se produce sin que aparezcan efectos esperados de la intoxicación o abstinencia. Se pueden dar tres circunstancias diferentes:

- a) El episodio se produce durante un período prolongado de abstinencia o de consumo ocasional de la sustancia, totalmente independiente en el tiempo.
- b) El episodio comienza por lo menos dos semanas antes del inicio de un período de consumo excesivo de sustancias (Figura 26)
- c) El episodio comienza durante el consumo de excesivo de la sustancia y continúa por lo menos durante 4 semanas o más después de que finalice el consumo (Figura 27).

Figura 26: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno primario previo a la intoxicación crónica Adaptación del manual del usuario PRISM 3.1

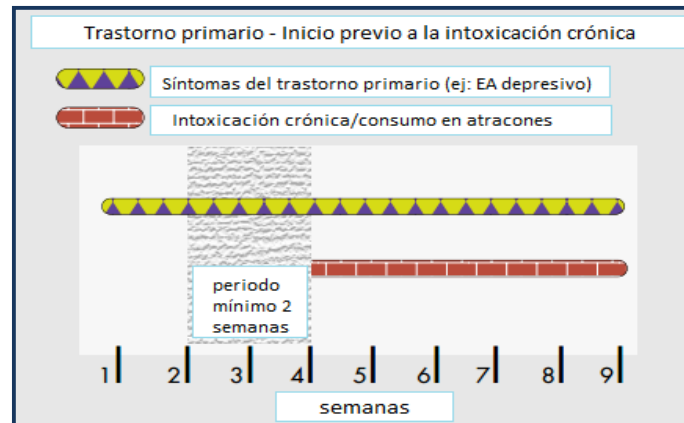
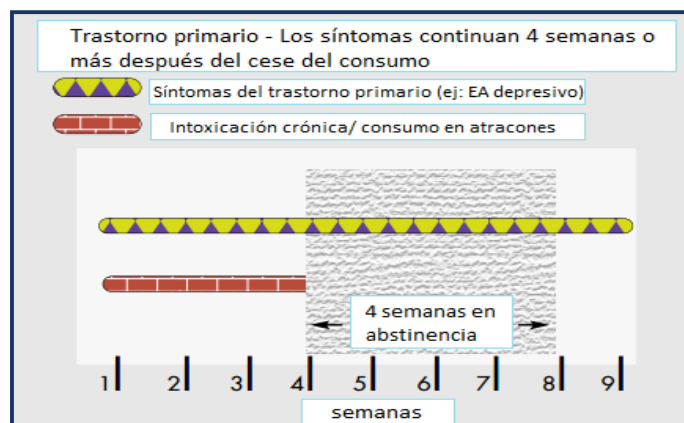


Figura 27: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno primario posterior a la intoxicación crónica. Adaptación del manual del usuario PRISM 3.1

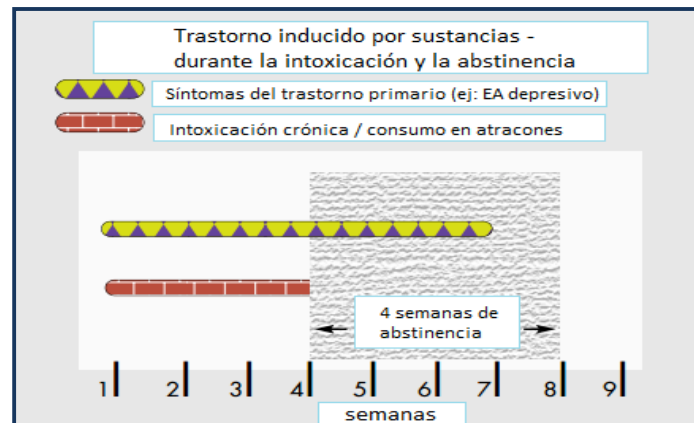


Trastornos inducidos por alcohol y por otras sustancias

Se realiza un diagnóstico de trastorno inducido por sustancias cuando se cumplen todos los criterios para el trastorno según el DSM-IV-TR y la sustancia consumida es relevante para el trastorno (los efectos de la sustancia pueden provocar los síntomas idénticos a los del trastorno que se está evaluando). Los síntomas tienen que ser claramente excesivos respecto a los síntomas esperados de la intoxicación y/o abstinencia. Se pueden dar dos circunstancias diferentes:

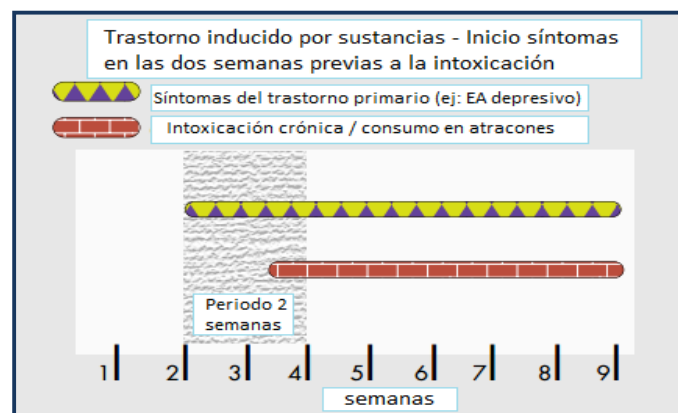
- El episodio ocurre totalmente durante un período de consumo de sustancias excesivo, o en las cuatro semanas posteriores a la interrupción del consumo (Figura 28)

Figura 28: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno inducido durante la intoxicación crónica. Adaptación del manual del usuario PRISM 3.1



- b) El consumo de sustancias comienza antes de que se cumplan dos semanas de haber empezado el episodio y el trastorno remite durante la intoxicación crónica, el consumo en atracones o con la abstinencia (Figura 29).

Figura 29: Temporalidad para el diagnóstico de trastorno inducido en las dos semanas previas a la intoxicación. Adaptación del manual del usuario PRISM 3.1



Es muy importante determinar un cambio importante en el consumo (incrementos o disminuciones). En la evaluación de sustancias como el alcohol, esta tiene que ser cuantitativa (cantidad de sustancia consumida) y cualitativa (la frecuencia del consumo).

La evaluación de sustancias incluye el alcohol y nueve clases de sustancias: cocaína, heroína, cannabis, alucinógenos, sedantes, estimulantes, opiáceos, metadona y otros fármacos que se consuman en cantidades mayores o con una frecuencia mayor a la pautada por el médico.

Efectos esperados de la abstinencia de alcohol

Para evitar estos síntomas a la hora de la evaluación, decidimos realizar la entrevista 4 semanas después del inicio del tratamiento, porque los efectos de la abstinencia de sustancias en ocasiones son idénticos a algunos síntomas de trastornos mentales primarios. Tomando como referencia un mes de abstinencia de alcohol, consideramos que los síntomas fisiológicos y psicológicos están acordes al estado basal del paciente, aunque en muchas ocasiones el paciente continúa con el cuadro ansioso-depresivo debido a la abstinencia de alcohol.

Diagnóstico de abuso y/o dependencia al alcohol y a otras sustancias

El diagnóstico de abuso normalmente precede al de dependencia, pero se evalúan de forma independiente. Existen cuatro síntomas de abuso y siete síntomas de dependencia y sólo es necesario un síntoma para realizar el diagnóstico de abuso. El episodio de dependencia hace referencia a la primera vez en que aparecieron simultáneamente al menos 3 síntomas en el periodo de un año. Las remisiones hacen referencia a periodos de mínimo un año y la recurrencia de la dependencia evalúa si después de algún momento de remisión, el paciente ha presentado de nuevo 3 síntomas a la vez.

3.3.1. Gravedad medida en los criterios de adicción al alcohol

La gravedad de síntomas por uso de alcohol se obtiene combinando los criterios DSM-IV-TR para el diagnóstico de abuso y de dependencia al alcohol. Este procedimiento se ha realizado en estudios similares en trastornos por uso de cocaína, se obtiene sumando los 4 criterios de abuso y los 7 criterios de dependencia. De esta forma se obtiene el grado de gravedad y resulta más sencillo evaluar de forma unidimensional el número de criterios de adicción.

Esta categorización dimensional de los diagnósticos de trastornos por uso de sustancias es una adaptación a los nuevos criterios DSM-V (Hasin et al., 2013; Pavón et al., 2013).

3.3.2. Evaluación de la comorbilidad psiquiátrica

Trastornos del estado de ánimo

Episodio depresivo mayor: este trastorno se caracteriza por un estado de ánimo depresivo o anhedonia la mayor parte del día, la mayoría de los días durante por lo menos dos semanas.

Distimia: Este diagnóstico requiere un estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, la mayoría de los días, durante al menos 2 años, sin ninguna remisión durante más de 2 meses seguidos.

Episodio maníaco: El diagnóstico de manía requiere la presencia de un período de estado de ánimo anormal y persistentemente elevado, expansivo o irritable, que dura al menos 1 semana con síntomas que la acompañan (fuga de ideas, disminución de la necesidad de dormir).

Episodio hipomaníaco: La hipomanía requiere el mismo estado de ánimo y síntomas, pero pueden tener una duración más corta (de por lo menos 4 días y que el episodio no cause deterioro acusado ni hospitalización ni síntomas psicóticos).

Ciclotimia: Este diagnóstico requiere un período de más de dos años de estado de ánimo alternante, y es un trastorno mucho menos frecuente.

Trastornos psicóticos

Los trastornos psicóticos se caracterizan por una fase activa y la aparición de ideas delirantes no extrañas que dependiendo de la duración del episodio puede cumplir criterios para los siguientes trastornos del DSM-IV. La entrevista evalúa síntomas psicóticos y negativos, síntomas y curso (inicio y progresión):

Trastorno psicótico breve: Su duración está entre 1 día y un mes

Trastorno delirante: Episodio sin deterioro

Trastorno esquizoafectivo: Aparición de depresión mayor o episodio maníaco durante más del 50% de la duración total del trastorno psicótico

Trastorno afectivo con síntomas psicóticos: Cuando los síntomas psicóticos siempre ocurren con un episodio afectivo

Trastorno esquizofreniforme: La duración de este trastorno es de menos de 6 meses

Esquizofrenia: Episodios de más de 6 meses de duración; la entrevista evalúa la fase prodrómica y residual

Trastornos de ansiedad

En este apartado solo es posible realizar dos diagnósticos inducidos por sustancias, el trastorno de angustia inducido por sustancias y el trastorno de ansiedad generalizada inducido por sustancias.

Fobia específica: Este trastorno hace referencia a un temor acusado persistente que es excesivo e irracional desencadenado por un objeto o situación, provocando siempre una ansiedad intensa inmediata.

Fobia social: En este trastorno se evalúa el temor persistente y acusado por una situación o actuación social provocando siempre una ansiedad intensa inmediata.

Trastorno de angustia: en este trastorno las crisis evaluadas deben ser recidivantes, vividas con preocupación y se deben producir cambios de comportamiento después de sufrir ansiedad inesperada.

Agorafobia: El trastorno de angustia se puede diagnosticar con agorafobia y agorafobia son historia de trastorno de angustia. Si el sujeto explica que evita la situación temida o que la resiste a costa de una ansiedad intensa y es incapaz de afrontar dicha situación sin estar acompañado.

Ansiedad generalizada: En este trastorno el sujeto evita la situación temida y experimenta preocupación y ansiedad irreales o excesivas durante al menos 6 meses totalmente aparte de otro trastorno psiquiátrico.

Trastorno obsesivo-compulsivo: Para el diagnóstico de este trastorno es necesario que las obsesiones sean persistentes y recurrentes y no preocupaciones excesivas acerca de problemas reales. Las compulsiones también deben ser persistentes y recurrentes y no proporcionar placer aparte de la liberación temporal de tensión o ansiedad ya que se realizan para reducir malestar o evitar alguna situación temida.

Trastorno por estrés post-traumático: Este trastorno investiga la presencia de acontecimientos traumáticos en el pasado del sujeto, y se evalúa como respondió a dicha situación y cómo le afecta en el momento presente.

Trastornos de la conducta alimentaria

Anorexia: en este trastorno se evalúa el IMC y se investiga si existe el rechazo a tener un peso corporal menor de 15% por debajo del peso adulto esperado, el miedo intenso a ganar peso o a estar obeso.

Bulimia: en este trastorno se evalúa atracones de comida y percepción de control, así como el curso y la frecuencia de conductas compensatorias.

Trastornos de la personalidad

Trastorno antisocial de la personalidad: Este diagnóstico requiere que el sujeto presente una historia de agresión, destrucción de la propiedad, fraudulencia o robo, y/o violaciones graves de las normas antes de los 15 años de edad con deterioro social, académico o laboral. Para ello, los comportamientos deben estar presentes desde los 15 años y continuar en la edad adulta.

Trastorno límite de la personalidad: Los sujetos con este trastorno suelen parecer dramáticos, emotivos e inestables. Tienen un patrón generalizado de inestabilidad en las relaciones interpersonales, la autoimagen, la afectividad, y una notable impulsividad que comienza al principio de la edad adulta.

Trastorno por déficit de atención e hiperactividad en la infancia (TDHA)

La evaluación del TDAH se realiza con carácter retrospectivo y también se explora sintomatología en la edad adulta. Este trastorno consiste en un patrón persistente de desatención y/o hiperactividad-impulsividad. Este trastorno es mucho más frecuente en varones que en mujeres.

Debido a la elevada comorbilidad de este diagnóstico en la población con TUA, para la parte descriptiva del primer estudio se utilizó la entrevista PRISM (*Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders*) (Hasin et al., 2001) en la evaluación clínica y el cuestionario WURS (*Wender-Utah Rating Scale*) (Ward, 1993) que es específico para la evaluación de TDAH en la edad adulta.

3.4. Procedimiento experimental de la exposición a alcohol en modelos animales

Para realizar los experimentos con etanol, las ratas se acostumbraron a las condiciones experimentales, incluyendo la manipulación y el procedimiento de alimentación forzada intragástrica durante un periodo de una semana usando una solución salina. Para la administración de alcohol, se utilizó una sonda intragástrica por la que se administraba a diario una solución de etanol (3 g/kg en solución salina) o una solución salina como vehículo durante un periodo de 4 semanas. Para la inducción de estrés, un grupo de ratas se sujetaron de manera individual por un periodo de 90 minutos en un retenedor cilíndrico de plexiglás (6 cm x 20 cm: diámetro x longitud) con agujeros de respiración en una sala de ensayo por separado, 48 h antes de comenzar con el tratamiento de etanol o solución salina.

Todas las ratas se sacrificaron por decapitación una semana después de la última sesión de etanol o solución salina intragástrica. Se recogieron muestras en sangre. Para la obtención de plasma, la sangre se centrifugó (2.000xg durante 15 minutos) y el plasma se mantuvo a -80° para su posterior análisis.

3.5. Determinación de parámetros bioquímicos

3.5.1. Diseño clínico

Las muestras de sangre de cada paciente se recogió por la mañana a primera hora (de 8:30 a 11:00h) por el equipo de enfermería, tras un periodo de ayuno de 8 a 12 horas y previa muestra de alcoholímetro, el día de la entrevista psiquiátrica u otro diferente, según los horarios de los pacientes. A partir de estas muestras se determinaron las concentraciones de diferentes moléculas circulantes.

Obtención y procesamiento de la sangre

La sangre periférica fue extraída y transportada en tres tubos de 10 ml con K2 EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras de sangre fueron inmediatamente procesadas para la obtención del plasma a través de su centrifugación a 2200 xg durante 15 minutos (4°C).

Seguidamente, tras haber obtenido el plasma de la fase sobrenadante, se realizaron análisis de forma individual para la detección de enfermedades infecciosas mediante test rápidos de detección para VIH (Retroscreen HIV, QualProDiagnostics-TulipGroup Ltd., Goa, India), hepatitis B (HBsAg test,

ToyoDiagnostics-Turklab Inc., Izmir, Turquía) y hepatitis C (Flaviscreeen HCV, QualProDiagnostics-TulipGroup Ltd.). Las muestras que resultaron positivas a alguna enfermedad infecciosa se eliminaron siguiendo los protocolos de seguridad.

Las muestras plasmáticas válidas fueron alicuotadas en varios criotubos perfectamente codificados y se almacenaron a -80°C hasta sus posteriores análisis. Uno de los tubos de sangre individual de cada paciente perteneciente al grupo alcohol (tras el análisis serológico) se enviaba el día de la extracción al Biobanco de la Red de Trastornos Adictivos. Junto a la muestra se enviaba un registro de datos sociodemográficos, tiempo de abstinencia, la exploración de trastornos mentales y de sustancias necesarias para rellenar el registro en su base de datos. Este envío se realizaba de manera urgente desde el hospital y lo recibían en Alicante a primera hora de la mañana para su correcto almacenamiento. Estas muestras están siendo analizadas en la actualidad para identificar polimorfismos genéticos en los genes candidatos responsables de la producción y función de los biomarcadores seleccionados, y constituyen una de las investigaciones derivadas de esta Tesis Doctoral.

3.5.1.1. Cuantificación de mediadores lipídicos

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de los siguientes monoacilglicerol y aciletanolamidas mediante separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) detección por espectrometría de masas:

Monoacilglicerol

2-araquidonil-glicerol (2-AG)

2-linoleilglicerol (2-LG)

2-oleoilglicerol (2-OG)

Aciletanolamidas

Oleiletanolamida(OEA)

Araquidoniletanolamida (AEA)

Esteariletanolamida(SEA)

Palmitiletanolamida (PEA)

Palmitoleiletanolamida(POEA)

Linoleiletanolamida (LEA)

Dihomo-gamma-linoleniletanolamida(DGLEA)

Docosaheptaeniletanolamina(DHEA)

Se emplearon formas deuteradas de estos derivados lipídicos como marcadores para la cuantificación: PEA-d3, OEA-d4, AEA-d4, LEA-d4, DHEA-d4, 2-AG-d5. Estos marcadores internos de mayor peso molecular permiten calibrar la cantidad de compuesto, obviando las pérdidas producidas por los procesos de extracción y separación.

La extracción y separación de todas estas moléculas se realizó mediante un sistema de HPLC-espectrometría de masa en tándem (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU) utilizado en otros estudios previos del laboratorio en modelos de cocaína (Pavón et al., 2013). La composición de la fase móvil fue: A)

0.1% (v/v) de ácido fórmico en agua; B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico en acetronitrilo.

El espectrómetro de masas empleado operó con una electropulverización positiva. La monitorización de reacción múltiple fue empleada para los análisis con los siguientes precursores para producir transiciones iónicas: m/z 328,1/62 para SEA, m/z 300,1/62 para PEA, m/z 304,4/66 para PEA-d4, m/z 326,1/62 para OEA, m/z 330,4/66 para OEA-d4, m/z 298,2/62 para POEA, m/z 348,3/62 para AEA, m/z 352,2/66 para AEA-d4, m/z 324,5/62 para LEA, m/z 328,5/66 para LEA-d4, m/z 372,6/62 para DHEA, m/z 376,3/66 para DHEA-d4, m/z 350,2/62 para DGLEA, m/z 379,2/287 para 2-AG, m/z 384,3/287 para 2AG-d5 y m/z 355,2/263 para 2-LG.

Se utilizó una curva externa de calibración de seis puntos en la fase móvil (10:90, A:B) y se empleó un incremento de presión de 0,4 a 25 ng de aciletanolamidas y de 0,8 a 50 ng de monoacilglicerol tal y como se ha realizado en estudios previos (Rivera et al., 2013). Los resultados de estas concentraciones plasmáticas se expresaron en ng/ml.

3.5.1.2. Cuantificación de mediadores inflamatorios

Las quimioquinas evaluadas en estos estudios fueron seleccionadas a partir de estudios previos sobre mediadores inflamatorios y trastornos psiquiátricos comórbidos relacionados con adicción, en los cuales se mostraba la presencia de estas señales (o sus receptores) en neuronas o células glía en circuitos relevantes para la adicción o relacionadas con trastornos mentales.

Para cuantificar las concentraciones plasmáticas de estas señales inflamatorias, se usó un sistema complejo de análisis *Bio-Plex Suspension Array System 200* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), un kit de inmunoensayo de Procarta con microesferas de poliestireno y un kit de dilución estándar (Affymetrix-Panomics, Santa Clara, CA, EE.UU.). Este método de análisis se basa en la tecnología *luminex* y en el empleo de paneles multiplex para la determinación simultánea de varios analitos. Las quimioquinas que se evaluaron fueron las siguientes:

CCL2 (MCP-1)
CCL3 (MIP-1 α)
CCL11 (eotaxina-1)
CXCL8 (IL-8)
CXCL12 (SDF-1)
CX₃CL1(fractalquina)

Las medidas de estos mediadores en plasma se realizaron siguiendo las siguientes instrucciones:

Después de preparar el tampón de lavado 1x a partir de 10x con agua bidestilada, la placa de 96 pocillos se incubó con 150 μ l de tampón de lectura durante 5 minutos a temperatura ambiente. 50 μ l de solución con esferas conjugadas con

anticuerpos fueron añadidos a cada pocillo de la placa. Tras añadir el tampón de lavado 1x, se añadió a cada pocillo 25 µl de tampón específico de plasma y 25 µl de estándares (rango= 0,62 pg/ml a 40600 pg/ml) ó 25 µl de muestras (con dos réplicas). La placa fue incubada en agitación durante una hora a temperatura ambiente y la solución fue eliminada por aspiración en vacío. Después la placa se lavó y se añadieron 25 µl de anticuerpo de detección multiplex, agitando la placa durante otros 30 min. Tras un nuevo lavado, se añadió a cada pocillo 50 µl de solución estreptavidina R-ficoeritrina durante 30 minutos, seguido de un nuevo lavado y la adición de 120 µl de tampón de lectura. Una última incubación durante 30 minutos se realizó antes de la cuantificación por el *luminex*.

Los datos (intensidad media de fluorescencia) se analizaron utilizando el programa *Bio-Plex Manager Software 4.1* (Bio-Rad Laboratories). Los datos fueron expresados como picogramos (pg) de proteína/ml de plasma.

3.5.2. Diseño experimental

En el plasma de rata, se midieron las siguientes quimioquinas [CXCL12 (SDF-1), CX₃CL1 (fractalquina) y CCL11 (eotaxina-1)] se midieron en plasma de rata utilizando con kits ELISA (Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay). Kit de ELISA para rata del factor 1 derivado de células estromales SDF-1 (producto #: SEA122Ra; Nube-Clone Corp., Wuhan, Hubei, República Popular China), Kit ELISA para rata de Fractalquina (CX₃CL1) (Producto #:ab100760; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y el Kit ELISA para rata eotaxina 1 (eotaxina-1/CCL11/EFC) (producto #:CSB-E07319r; Cusabio, College Park, MD, EE. UU). Las placas se leyeron a 450 nm dentro de un tiempo de 30 minutos a una longitud de onda de 540 nm conjunto o 570 nm. Los datos se expresan como ng de proteína/mL de plasma.

3.6. Análisis estadísticos

Todos los datos de las tablas y gráficos fueron expresados en número y porcentajes de sujetos [n (%)], medias y desviación estándar de las concentraciones [media (SD)] o valores individuales de variables (correlaciones). Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas SPSS versión 22 (IBM, Amonk, NY, EE.UU.) y Graph-PadPrism versión 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

Análisis y distribución de medias

Las prevalencias [n(%)] obtenidas a partir del diseño de tablas de contingencia para diferentes grupos o categorías fueron evaluadas estadísticamente mediante pruebas de significación estadística aplicando contrastes de hipótesis mediante el “test exacto de Fisher” en la comparación de dos grupos respecto a una variable dicotómica o la “prueba de chi-cuadrado (χ^2)” en la valoración de la relación entre dos variable cualitativas dicotómicas cada una de ellas. Consideramos un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Las medias marginales estimadas se representan con 95% de intervalo de confianza (95% CI).

Respecto a las variables discretas y continuas, se valoró la distribución de dichas variables con la prueba de normalidad “D’Agostino & Pearson” para aplicar estadística paramétrica o no paramétrica en cada caso correspondiente a realizar una comparación de medias. Para comparar dos grupos, si las distribuciones cumplían criterios de normalidad, se utilizó la prueba “t de Student”.

En aquellos grupos cuyas distribuciones no cumplían criterios de normalidad se aplicó la prueba “U de Mann-Whitney”.

Para la comparación de tres grupos o más se empleó un análisis de varianza (ANOVA) en aquellas distribuciones que cumpliesen criterios de normalidad. Con criterios de no normalidad se realizaba la prueba ANOVA de rangos o “Kruskal-Wallis”. Se realizaron *a posteriori* comparaciones múltiples pareadas tras el ANOVA y la prueba de Kruskal-Wallis.

Análisis de correlaciones

Para los análisis de correlación lineal de dos variables aleatorias cuantitativas o continuas se empleó el “coeficiente de correlación de Pearson” (r) en supuestos de normalidad y se empleó el “coeficiente de Spearman” ($\rho(\text{rho})$) para variables aleatorias continuas que no cumplen los supuestos de normalidad.

Análisis de regresión logística y curvas ROC

Para determinar las variables predictoras se partió del análisis de concentraciones mediante un modelo de regresión logística binaria basado en probabilidades. La calibración del modelo logístico se valoró mediante el test Hosmer-Lemeshow. Además, se calculó el poder discriminativo del modelo logístico obtenido mediante el análisis “receiver operating characteristics” (ROC). Considerando el área bajo la curva, se calcula la sensibilidad y la especificidad.

Análisis de covarianza (ANCOVA)

Se trata de un modelo lineal general con una variable cuantitativa y uno o más factores, siendo la fusión de un ANOVA y una regresión lineal múltiple. Este análisis permite eliminar la heterogeneidad de la variable dependiente por la influencia de una o más variables cuantitativas. La inclusión de covariables puede aumentar la potencia estadística aunque a menudo reduce la variabilidad. En estos cálculos se realizan transformaciones logarítmicas de algunas variables con el fin de que no se vea comprometida la normalidad de las distribuciones. Se han realizado correcciones *a posteriori* utilizando el test de Sidak que ofrece unos límites más estrechos que los de la aproximación de Bonferroni.

3.6.1. Estadística Estudio I

Para este estudio descriptivo se realizaron análisis sencillos de distribución de medias y de correlaciones lineales. Las prevalencias [n(%)] obtenidas a partir del diseño de tablas de contingencia para diferentes grupos o categorías fueron

evaluadas estadísticamente mediante pruebas de significación estadística aplicando contrastes de hipótesis mediante el “test exacto de Fisher” en la comparación de dos grupos respecto a una variable dicotómica o la “prueba de chi-cuadrado (χ^2)” en la valoración de la relación entre dos variables cualitativas dicotómicas cada una de ellas. Consideramos un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Las medias marginales estimadas se representan con 95% de intervalo de confianza (95% CI).

Respecto a las variables discretas y continuas, se valoró la distribución de dichas variables con la prueba de normalidad “D’Agostino & Pearson” para aplicar estadística paramétrica o no paramétrica en cada caso correspondiente al realizar una comparación de medias. Para comparar dos grupos, si las distribuciones cumplían criterios de normalidad, se utilizó la prueba “t de Student”.

En aquellos grupos cuyas distribuciones no cumplían criterios de normalidad se aplicó la prueba “U de Mann-Whitney”.

Para los análisis de correlación lineal de dos variables aleatorias cuantitativas o continuas se empleó el “coeficiente de correlación de Pearson” (r) en supuestos de normalidad y se empleó el “coeficiente de Spearman” (ρ (rho)) para variables aleatorias continuas que no cumplen los supuestos de normalidad.

3.6.2. Estadística Estudio II

Los datos se expresaron como número, porcentaje y desviaciones estándar de concentraciones. La significación de las diferencias en las variables categóricas se determinó por la prueba exacta de Fisher, mientras que las variables continuas fueron evaluadas por diferentes enfoques estadísticos de acuerdo con el número de comparaciones y supuestos paramétricos. Para las comparaciones de dos grupos, se utilizaron las pruebas t de Student y Mann-Whitney como pruebas paramétrica y no paramétrica, respectivamente. También se realizaron múltiples análisis de covarianza (ANCOVA) y modelos de regresión lineal con transformaciones logarítmicas para asegurar suposiciones estadísticas normales en las concentraciones de aciletanolamidas estudiadas como variables dependientes. Las comparaciones múltiples del ANCOVA utilizando la corrección de la prueba de Sidak.

Se utilizaron modelos de regresión logística binaria para identificar el subconjunto de aciletanolamidas que mejor distinguen entre el grupo alcohol y los sujetos control. Todos los modelos han superado las pruebas de Hosmer-Lemeshow de la linealidad del logaritmo. Las características de la curva ROC evalúa el poder discriminativo de los modelos logísticos a través del área bajo la curva (AUC) y estimando la sensibilidad y la especificidad. Además, se realizaron análisis de correlación a través del coeficiente de correlación de Spearman.

3.6.3. Estadística Estudio III

El análisis estadístico de las concentraciones de quimioquinas se realizó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) para indicar el efecto relativo de las variables explicativas y sus interacciones en la expresión de quimioquinas en el plasma controlando las variables adicionales. Se realizaron transformaciones logarítmicas para asegurar supuestos estadísticos para distribuciones asimétricas positivas. Las comparaciones múltiples del ANCOVA utilizando la corrección de la prueba de Sidak. Los análisis de correlación se llevaron a cabo utilizando el coeficiente de Pearson.

En cuanto a los datos de estudios en ratas, se llevaron a cabo pruebas t de Student y análisis de varianza (ANOVA). Las concentraciones de quimioquinas en plasma de rata se expresan como media y error estándar de la media (SEM).

4. Resultados

Estudio I

Comorbilidad psiquiátrica y valores plasmáticos de 2-acilglicerol en consumidores de alcohol en tratamiento ambulatorio. Análisis de las diferencias de género.

Psychiatric comorbidity and plasma levels of 2-acyl-glycerols in outpatient treatment alcohol users. Analysis of gender differences.

Nuria García-Marchena^{1,5#}; Pedro Araos^{1,5#}; Francisco Javier Pavón^{1,5}; Guillermo Ponce²; María Pedraz^{1,5}; Antonia Serrano^{1,5}; Francisco Arias^{2,5}; Pablo Romero^{1,5}; Juan Suárez^{1,5}; Antoni Pastor^{4,7}; Rafael de la Torre^{3,4,6}; Marta Torrens^{3,4,5}; Gabriel Rubio^{1,5}; Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,5}.

¹Unidad Gestión Clínica de Salud Mental. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, Spain; ²Instituto de Investigación I+12, Hospital 12 de Octubre, Psychiatry Service, Madrid 28041, Spain; Department of Psychiatry, Complutense University of Madrid, 28040, Spain. ³Neurosciences Program, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM); ⁴Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) del Parc de Salut MAR. Barcelona, Spain; ⁵Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III; ⁶Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Barcelona, Spain; ⁷Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Publicado en:

adicciones revista versión online

Comorbilidad psiquiátrica y valores plasmáticos de 2-acilglicerol en consumidores de alcohol en tratamiento ambulatorio. Análisis de las diferencias de género

Psychiatric comorbidity and plasma levels of 2-acyl-glycerols in outpatient treatment alcohol users. Analysis of gender differences

NURIA GARCÍA-MARCHENA*,*****#; PEDRO ARAOS*,*****#; FRANCISCO JAVIER PAVÓN*,*****; GUILLERMO PONCE**, MARÍA PEDRAZ*,*****; ANTONIA SERRANO*,*****; FRANCISCO ARIAS**,*****; PABLO ROMERO-SANCHIZ*,*****; JUAN SUÁREZ*,*****; ANTONI PASTOR****,*****; RAFAEL DE LA TORRE***,****,*****; MARTA TORRENS***,****,*****; GABRIEL RUBIO*,*****; FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA*,*****.

*Unidad Gestión Clínica de Salud Mental. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, Spain; **Instituto de Investigación I+12, Hospital 12 de Octubre, Psychiatry Service, Madrid 28041, Spain; Department of Psychiatry, Complutense University of Madrid, 28040, Spain; ***Neurosciences Program, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM); ****Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) del Parc de Salut MAR. Barcelona, Spain; *****Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III; *****Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Barcelona, Spain; *****Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. (#) Estos autores contribuyeron de la misma forma en este trabajo.

Resumen

La adicción al alcohol se asocia con una elevada comorbilidad psiquiátrica que complica el tratamiento, siendo necesaria una fenotipación clínica objetiva de estos pacientes para optimizar la atención y mejorar el pronóstico. El presente estudio aborda este problema mediante los siguientes objetivos: a) estimar la prevalencia y tipos de comorbilidad psiquiátrica de una muestra de pacientes que buscan tratamiento por uso de alcohol, b) describir las diferencias de género en su presentación y c) analizar los valores plasmáticos de 2-acilglicerol (incluyendo el endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol), estudiando su posible valor como biomarcador de alcoholismo y/o comorbilidad psiquiátrica. Para ello se reclutaron 162 pacientes evaluados con la entrevista semiestructurada PRISM, para evaluar la presencia de comorbilidad y su carácter primario o inducido. Los resultados obtenidos indican que la presencia de psicopatología se asoció a un mayor número de criterios de abuso y dependencia de alcohol. Se encontraron diferencias de género tanto en la comorbilidad psiquiátrica, especialmente en trastornos del estado de ánimo. La prevalencia de comorbilidad psiquiátrica encontrada a lo largo de la vida fue del 68,5%, destacando los trastornos del estado de ánimo (37%), y seguidos por el trastorno por déficit de atención (24,7%, monitorizado específicamente por la entrevista WURS) y los trastornos de ansiedad (17,9%). Entre los trastornos del estado de ánimo y psicóticos fueron más frecuentes los inducidos, mientras que en los trastornos de ansiedad los primarios fueron más prevalentes. Además, se encontraron concentraciones disminuidas significativamente de 2-acilglicerol en pacientes con trastornos de ansiedad comórbidos diagnosticados en el último año.

Palabras clave: Comorbilidad psiquiátrica; Adicción; Alcohol; Ambulatorio; Género; 2-acilglicerol.

Abstract

Alcohol addiction is associated with high psychiatric comorbidity. Objective stratification of patients is necessary to optimize care and improve prognosis. The present study is designed to gain insights into this challenge by addressing the following objectives: a) to estimate the prevalence of psychiatric comorbidities in a sample of outpatients seeking treatment for alcohol use disorder, b) to describe the existence of gender differences and c) to validate 2-acyl-glycerols as biomarkers of alcohol use disorder and/or psychiatric comorbidity. One hundred and sixty-two patients were recruited and evaluated with the semi-structured interview PRISM. The presence of psychopathology was associated with a greater number of criteria for alcohol abuse and dependence according to DSM-IV-TR. We found gender differences in psychiatric comorbidity, e.g., mood disorder, as well as in comorbid substance use disorders. The prevalence of lifetime psychiatric comorbidity was 68.5%, with mood disorders the most frequent (37%), followed by attention deficit disorder (24.7%) and anxiety disorders (17.9%). Substance-induced disorders were more frequent in mood and psychotic disorders, whereas the primary disorders were more prevalent in patients with comorbid anxiety disorders. We found that 2-acyl-glycerols were significantly decreased in comorbid anxiety disorders in alcohol dependent patients in the last year, which makes them a potential biomarker for this psychopathological condition.

Keywords: Psychiatric co-morbidity; Addiction; Alcohol; Outpatient; Gender; 2-acyl-glycerols.

Recibido: Noviembre 2015; Aceptado: Noviembre 2015.

Enviar correspondencia a:

Fernando Rodríguez de Fonseca y Pedro Araos. Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital R. U. de Málaga 82, sótano. Málaga 29010, España. Teléfono: +34 952614012. Fax: +34 952614012. Correo electrónico: fernando.rodriguez@ibima.eu; pedro.araos@ibima.eu.

El alcohol es una sustancia psicoactiva con propiedades adictivas, cuyo consumo ocasiona un gran impacto económico, social y sanitario en los individuos de una población. El uso nocivo de esta sustancia es un factor etiológico de mortalidad a nivel global y hasta el año 2012, un 5,9% de las muertes se encontraron relacionadas con el alcohol (World Health Organization, 2014). En España, las tendencias de consumos de bebidas alcohólicas en los últimos 10 años se encuentran estabilizadas, aunque las tasas de uso son elevadas. El 4,9% de la población de 15 a 65 años presenta un consumo problemático de alcohol, y el 4,5% presentan consumo de riesgo [1.600.000 personas, 1.300.000 hombres y 300.000 mujeres]. La edad media de inicio de consumo de alcohol se sitúa en 16,7 años y se asocia a una mayor prevalencia de consumo de otras drogas, ya que el alcohol está presente en el 90% de los policonsumos (Encuesta EDADES, 2013).

Dado que los trastornos por uso de alcohol (TUA) son frecuentes, su asociación con otras complicaciones médicas constituye un reto para los sistemas sanitarios. De entre éstas la comorbilidad psiquiátrica en el alcoholismo, es decir, la coexistencia en una misma persona de TUA y de otro trastorno mental distinto del adictivo, constituye un problema serio de salud (Goldsmith, 1999) que demanda un abordaje diferencial. Los pacientes que presentan comorbilidad psiquiátrica conforman un grupo de riesgo desde una visión clínica y social. Frecuentan en mayor medida los servicios hospitalarios (Ruffles, 2009), tienen mayores tasas de suicidios (Fiedler et al., 2012) y tienen valores de respuestas al tratamiento peores que pacientes sólo con TUA (Karila et al., 2012). Por otra parte, desde un punto de vista social son pacientes con mayor carga de conflictos a nivel laboral, judicial y de inserción social (Karila et al., 2014).

Los pacientes con TUA tienen de 2 a 4 veces más riesgo de padecer un trastorno depresivo a lo largo de su vida que aquellas personas que no presentan dependencia al alcohol (Hasin et al., 2005, 2007; Kessler et al., 1997; Ross, 1995). El estudio norteamericano National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC) recoge prevalencias de 39,5% en población con TUA en comparación con un 14,8% correspondiente a población general y también una elevada comorbilidad psicopatológica de TUA con trastornos del estado de ánimo (TEA), de ansiedad (TA) y de personalidad (TP) (Grant et al., 2004). Sobre los trastornos psicóticos, la prevalencia en población general sería de un 0,4% mientras que en población con TUA aumentaría a un 4,0% (Engelhard et al., 2015).

Estos datos americanos se corresponden también con estudios realizados en Europa. En Copenhague, el 7,6% de la población general presentaba TUA y la mitad de ellos, con un trastorno mental comórbido: TP (24%), TEA (16,8%) o TUS (16,6%) (Flensborg-Madsen et al., 2009). En el año 2010, la prevalencia de TUA en nuestro país fue de 2,3% en hombres y de 1,3% para ambos sexos (WHO, 2014). Los

trastornos derivados del uso del alcohol como la intoxicación, dependencia o los síntomas de abstinencia, empobrecen la mayoría de las relaciones sociales (Blanco et al., 2015). Los pacientes con elevada severidad en el trastorno por dependencia de alcohol, tienen alta persistencia de tener trastornos afectivos y de ansiedad (Blanco et al., 2015). Así, en un estudio efectuado en Madrid, con pacientes hospitalizados, el 24,9% presentaban abuso de sustancias y la mayoría de ellos (78,1%) presentaban TUA (Rodríguez-Jimenez et al., 2008).

El perfil de paciente que busca tratamiento por TUA es distinto al paciente con TUS, ya que los síntomas de abstinencia propios del TUA influyen en la búsqueda y motivación a la hora de acceder a un programa de tratamiento (Blanco et al., 2015). Por todo esto, las personas que presentan TUA tienen una mayor prevalencia de comorbilidad con otros trastornos mentales que la población general y dicha comorbilidad conlleva un TUA más grave, más discapacidad y mayor probabilidad de que soliciten tratamiento en una centro de salud mental, lo cual refuerza la necesidad de una buena detección de TUA en los pacientes atendidos en los centros de salud mental.

Tanto la comorbilidad psiquiátrica TUS como la presencia de comorbilidad psiquiátrica no relacionada con sustancias son factores que contribuyen a la progresión del abuso de alcohol hasta llegar a la dependencia de esta sustancia. En cuanto a la comorbilidad TUA y las diferencias de género, se sabe que las mujeres comienzan a beber a edades más avanzadas que ellos y desarrollan criterios de dependencia en menos tiempo que los hombres (Keyes et al., 2010). En pacientes con TUA los hombres tienen mayores prevalencias en trastornos de personalidad, mientras que ellas tienen mayor presencia de otro tipo de trastornos psiquiátricos (Ávila Escribano et al., 2007). A la luz de las diferencias de género, consideramos necesario enfatizar la importancia de establecer programas y estrategias para controlar el consumo excesivo de alcohol y la creciente ingestión de esta sustancia en la población femenina, describiendo las similitudes y diferencias en el patrón de consumo y comorbilidad psiquiátrica que pudieran darse.

Como podemos observar, son muy pocos los estudios que traten el fenómeno de la comorbilidad psiquiátrica en población con TUA en España, por tanto este trabajo podría servir de referencia para ampliar este campo del conocimiento, en especial en el entorno ambulatorio hospitalario.

Por otro parte, uno de los problemas básicos de la práctica clínica en adicciones es la carencia de pruebas biológicas objetivas que determinen el grado de consumo, la gravedad del TUS, toxicidad y respuesta a tratamiento de pacientes con estas características. Estas pruebas objetivas, biomarcadores, serían fundamentales en el diagnóstico, estratificación, pronóstico y orientación terapéutica en trastornos adictivos. Una manera de buscar biomarcadores consiste en explorar compartimentos de señalización celular que tienen

que ver con la modulación de la respuesta a sustancias adictivas, tal y como se ha podido comprobar en pacientes consumidores de cocaína (Araos et al., 2014; Pavón et al., 2013; Pedraz et al., 2015). En el presente estudio nos centraremos en el estudio de moléculas de señalización denominadas acilglicerol, que son ésteres formados a partir de ácidos grasos, las moléculas más conocidas de este tipo incluyen al 2-araquidonil-glicerol (2-AG) y el 2-linolil-glicerol (2-LG). El 2-AG es el principal endocannabinoide endógeno y su actividad está ligada a la preferencia alcohólica así como al desarrollo de tolerancia, como demuestran múltiples estudios en modelos preclínicos (Basavarajappa et al., 2005; Caillés et al., 2007; Malinen et al., 2009; Serrano et al., 2012). Estos compuestos están presentes en el sistema nervioso central con niveles incluso más abundantes que otros transmisores lipídicos como las aciletanolamidas, con las que comparten su perfil cannabinoide endógeno (Piomelli, 2003).

En resumen, el presente estudio se ha diseñado para valorar la prevalencia en pacientes con TUA que han solicitado atención ambulatoria de comorbilidad psiquiátrica, describiendo las diferencias de género y determinando los valores plasmáticos de acilglicerol y su valor como biomarcadores.

Método

Diseño y población objeto del estudio

En el año 1994 se creó, en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, un programa específico para dar una respuesta integral al paciente con TUA en forma de unidad mixta médico-psiquiátrica (pacientes aunados por los servicios de Psiquiatría, Medicina Interna y Digestivo). En esta unidad se ha procedido al reclutamiento de pacientes para realizar un estudio observacional transversal y descriptivo con el objetivo de determinar la prevalencia de las comorbilidades psiquiátricas en sujetos que acuden en busca de tratamiento y de obtener una muestra biológica de plasma para la validación de los 2-acilglicerol como biomarcadores.

El estudio se realizó con una muestra de 262 participantes divididos en dos grupos: pacientes en abstinencia que acudieron a tratamiento ambulatorio por deshabituación de alcohol en el programa de trastornos relacionados con las conductas adictivas del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid por un diagnóstico de TUA, y sujetos control sin diagnóstico de abuso y/o dependencia de sustancias legales e ilegales y sin antecedentes de diagnóstico psiquiátrico concomitante (ambos según criterios diagnósticos DSM-IV-TR). Se incluyeron en el estudio de evaluación clínica, 162 pacientes que participaban en el programa anteriormente descrito, de los cuales 133 consintieron donar una muestra biológica, además de, 100 sujetos controles emparejados por edad, género e índice de masa corporal.

Para el cálculo del tamaño muestral se tomó como referencia el trabajo de Pérez-Gálvez y colaboradores (Pé-

rez-Gálvez et al., 2008), en el que la prevalencia de comorbilidad psiquiátrica en pacientes con TUA es de un 70% aproximadamente. Para conseguir una precisión del 8% en la estimación de una proporción mediante un intervalo de confianza asintótico normal al 95% bilateral, asumiendo que la proporción es del 70%, será necesario incluir para este estudio una muestra de 160 sujetos aproximadamente. Dados los objetivos del estudio, en la selección de los sujetos de la muestra se adopta una actitud pragmática. Por ello se emplean unos criterios no restrictivos con el propósito de maximizar la representatividad de la muestra seleccionada y la extrapolación de los resultados del estudio. Se aplicó un muestreo consecutivo no aleatorio, reclutando a los pacientes según acudían a la unidad ambulatoria hospitalaria y tras cumplir los criterios de selección.

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la participación en el estudio fueron: ser paciente del programa y estar en tratamiento, en fase de deshabituación por TUA y con una abstinencia de alcohol mínima de 30 días, y estar dispuesto a participar firmando el consentimiento informado. Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la participación en el estudio para los sujetos controles fueron: no tener historia de abuso y/o dependencia de sustancias, comorbilidad psiquiátrica concomitante y consentimiento informado firmado.

Los criterios de exclusión que se tuvieron en cuenta para los pacientes en abstinencia y también para los sujetos controles fueron: la presencia de alteraciones cognitivas que dificultasen la aplicación de los instrumentos de evaluación diagnóstica y el rechazo de participar en el estudio por parte del paciente.

Los aspectos éticos del presente estudio fueron aprobados por el comité de ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Todos los pacientes fueron informados y se reclutaron aquellos que firmaron el consentimiento informado aprobado por dicho comité. Este estudio está enmarcado en el programa "Consecuencias médicas del alcoholismo" de la Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III.

El proceso de evaluación fue realizado por un psicólogo sanitario general con formación especializada y acreditada en evaluación psicopatológica.

Procedimiento

Se contó con la colaboración de los psiquiatras y enfermeras del programa para informar a los pacientes en consulta y en terapia de grupo acerca de la existencia del estudio previo su consentimiento, si estos cumplían los criterios de inclusión establecidos. Una vez citado el paciente y/o el sujeto control y firmado el consentimiento se realizaba la evaluación clínica en el Centro de Actividades Ambulatorias del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

El proceso de evaluación psicopatológica se realizaba en una misma mañana y podía durar de 1 hasta 2 horas, en

consulta individual. Las entrevistas se realizaron durante los meses de Octubre del 2013 hasta marzo del 2015, y al finalizar cada entrevista física se registraban los datos en una base de datos diseñada para este estudio.

Instrumentos de Medida

PRISM. La entrevista diagnóstica PRISM (*Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases*) es el principal instrumento utilizado para valorar los trastornos psiquiátricos y por sustancias. Se trata de una entrevista clínica semiestructurada diseñada para resolver los problemas de diagnóstico en personas con un consumo elevado de sustancias y/o alcohol, evaluando en un primer módulo preguntas del historial de consumo del sujeto, arrojando diagnóstico de abuso y dependencia tanto en el último año como en el pasado. Además, evalúa 20 trastornos del Eje I y los dos trastornos del Eje II más prevalentes en esta población: el trastorno límite de la personalidad y el trastorno antisocial de la personalidad. Los diagnósticos se realizan en dos marcos temporales de evaluación. Por un lado, la entrevista valora los trastornos actuales, es decir, los que están presentes durante el último año. Por el otro, evalúa los trastornos previos, es decir, los definidos con anterioridad al último año. De manera general, la prevalencia diagnóstica presentada por un sujeto "a lo largo de la vida" incluiría la totalidad de los diagnósticos observados en ambos periodos temporales, es decir, los actuales más los previos.

Una de las características más importantes de este instrumento es que permite diferenciar los trastornos inducidos por sustancias, así como los síntomas esperados del efecto de la intoxicación y la abstinencia. El criterio establecido por la PRISM para que un trastorno psiquiátrico pueda ser considerado inducido por la sustancia, es que debe ocurrir en el contexto de un consumo patológico de la sustancia, en cualquiera de estas dos situaciones: a) intoxicación crónica, es decir, un consumo de cuatro o más días a la semana durante un mes; b) atracones, durante un periodo de consumo de tres días continuados. Para diferenciar los síntomas psiquiátricos inducidos de los esperados durante la intoxicación o la abstinencia, se debe determinar si hubo un cambio brusco en el patrón de consumo (Hasin et al., 1996; Torrens et al., 2004).

Esta entrevista presenta buena fiabilidad test-retest, validez y fiabilidad inter-examinadores (coeficiente Kappa oscila entre 0,66 y 1,00) (Morguello et al., 2006).

WURS. Debido al especial interés existente entre la asociación del TUA y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), se procedió a evaluar la prevalencia del TDAH utilizando un instrumento adicional, la prueba WURS (*Wender-Utah Rating Scale*). Esta prueba se utiliza para la evaluación retrospectiva del diagnóstico de TDAH en pacientes adultos. Se trata de un cuestionario auto-aplicado de 61 ítems, entre los que se han seleccionado 25 por su capacidad para discriminar a los pacientes adultos, con antecedentes de

TDAH en la infancia, de otras poblaciones como controles y depresivos. La WURS ha demostrado una consistencia interna y una estabilidad temporal satisfactorias en varios trabajos. Se recogen preguntas sobre estados de ánimo, problemas de relación con familiares, compañeros y figuras de autoridad, problemas médicos, escolares y académicos. El coeficiente de Cronbach para esta subescala fue de 0,94. El punto de corte de 32 optimizaba sensibilidad (91,5%).

CIDI. Para la evaluación psiquiátrica de los sujetos control se utilizó la versión española de la Composite International Diagnostic Interview (CIDI) (Robins et al., 1988). Esta entrevista estructurada tiene una sección que evalúa 22 diagnósticos de distintos trastornos en forma de cribado que evalúa entre otros trastornos de inicio en la infancia y otros trastornos (como trastornos psicóticos) (Kessler y Üstün, 2004). Además, para la evaluación de trastornos de los controles se utilizó el apartado de historial de uso de drogas de la entrevista PRISM.

Procesamiento de sangre y obtención de muestras plasmáticas

Las muestras de sangre periférica de los 233 donantes (133 pacientes en abstinencia y 100 sujetos control) se obtuvieron por la mañana tras 8-12 horas de ayuno (el mismo día de la entrevista). Se extrajeron 10 mL de sangre periférica utilizando tubos BD vacutainer® con K2 EDTA por el personal de enfermería colaborador en el estudio. Para obtener el plasma, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 2200 xG durante 15 minutos. Para descartar la presencia de enfermedades infecciosas (SIDA-VIH, hepatitis B y C) se realizaron pruebas inmediatas para cada una de las muestras. Cada una de las muestras de plasma se registró y caracterizó de forma individual, descartando aquellas que mostraran algún tipo de infección tras el uso de los protocolos de seguridad. Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. El tiempo entre extracción y congelación del plasma nunca superó los 30 minutos.

Análisis de las concentraciones plasmáticas de 2-acilglicerol

Las muestras de plasma fueron procesadas según técnicas descritas tras una extracción orgánica de los lípidos del plasma (Pavón et al., 2013). La separación cromatográfica se realizó con una columna Zorbax StableBond 80 Å C8 (2,1 x 100 mm, 1,8 micras de tamaño de partícula) mantenida a 40° C con un caudal de la fase móvil de 0,4 mL/min. La composición de la fase móvil fue: A) 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua. B) 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo. Las condiciones iniciales fueron de un 40 % de B. El gradiente se incrementó linealmente hasta 100 % de B durante 4 minutos, mantenido a 100 % de B durante 4 minutos, y regresaron a las condiciones iniciales de unos 5,5 minutos más con un tiempo total de 13,5 minutos. El espec-

trómetro de masas cuadrupolar en tándem operado en el modo de electropulverización positiva. Una temperatura de gas de desolvatación de 350 ° C y una velocidad de flujo de gas de 10 L se utilizaron / min. La presión del nebulizador se fijó en 40 psi y la tensión capilar a 4.000 V. El fragmentador se fijó en 135 V y el tiempo de permanencia a 20 ms para todos los analitos. El modo de monitorización de reacciones múltiples se utilizó para el análisis con la siguiente precursor a las transiciones de iones producto: m / z 379.2 / 287 para el 2- AG, m / z 384.3/287 para el 2- AG- d5 y m / z 355.2/263 para 2 -LG.

Descripción del estudio

El estudio descriptivo abordó los siguientes objetivos: La existencia de diferencias de género en las características socio-demográficas y patrones de uso de alcohol; la prevalencia de comorbilidad psiquiátrica TUA y TUS (abuso y/o dependencia) en los pacientes reclutados; la prevalencia de comorbilidad psiquiátrica no TUS y finalmente el análisis de las concentraciones plasmáticas de 2-acilgliceroleos en esta población, comparándola con la población control, y determinando las asociaciones existentes con la comorbilidad psiquiátrica de los pacientes reclutados.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron mediante números, porcentaje de sujetos [n (%)], medias y desviaciones estándar (DE). Las diferencias en las variables categóricas se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) mientras que las variables continuas se evaluaron mediante diferentes enfoques estadísticos de acuerdo con el número de comparaciones y la distribución de las variables. Para las comparaciones de dos grupos, se utilizó el estadístico t de Student (t-test) para las variables continuas con distribución normal y el test de Mann-Whitney como prueba no paramétrica. Para las comparaciones de tres o más grupos, se utilizó el análisis Kruskal-Wallis y para los análisis no paramétricos se utilizó el estadístico post-test Dunn. La distribución normal de las variables fue evaluada utilizando el test de normalidad general de D'Agostino y Pearson. El valor *p* menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Para los análisis estadísticos se utilizaron el programa estadísticos SPSS versión 19.0 (SPSS Inc., an IBM Company) y la versión 5.04 del Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

Características socio-demográficas y diferencias de género.

La descripción de los resultados socio-demográficos de la muestra de 162 sujetos se encuentra en la Tabla 1.

En relación a las variables socio-demográficas, en función de las diferencias de género, podemos decir que el

75,3% de la muestra estuvo compuesto de hombres y un 24,7% de mujeres, sin diferencias en cuanto a la edad [media: 49,3 años (DE=8,1)]. El índice de masa corporal (IMC) fue muy significativamente (**p*<0,01) distinto entre géneros, siendo menor en mujeres [media: 24,1 (DE=3,9)] que en hombres [media: 26,8 (DE=4,5)]. Otras diferencias muy significativas en relación al género (**p*<0,01) se dieron en antecedentes judiciales y medicación psiquiátrica. Los hombres tienen más antecedentes judiciales, y ellas toman más medicación psiquiátrica que ellos. Hay diferencias significativas (**p*<0,05) en el estado civil, donde el 41% de los hombres y el 25% de mujeres estaban casados. También hubo diferencias significativas (**p*<0,05) en los trastornos por uso de sustancias (TUS), donde el 25% de las mujeres presentaban comorbilidad TUS frente al 44,3% de los hombres. Y por último, hubo diferencias significativas (**p*<0,05) en comorbilidad psiquiátrica de otros trastornos no relacionados con uso de sustancias donde el 82,5% de las mujeres presentaban comorbilidad frente al 63,9% de los hombres en esta variable.

Patrones de uso de alcohol en función del género y comorbilidad psiquiátrica.

Las variables relacionadas con los patrones de uso de alcohol y las diferencias de género y comorbilidad psiquiátrica distinta de los trastornos de sustancias se encuentran reflejadas en la Tabla 2.

Encontramos diferencias muy significativas (**p*<0,01) en la variable edad del primer del consumo de alcohol, donde las mujeres [media 18,2 años (DE=3,2)] tardan más años en probar el alcohol que los hombres [media 15,92 años (DE=3,6)]. También habría diferencias significativas (**p*<0,05) en la variable edad de inicio del consumo problemático en género y comorbilidad psiquiátrica. En esta ocasión, entre el grupo de hombres con comorbilidad psiquiátrica [media 25,73 años (DE=9,8)] y el mujeres con comorbilidad psiquiátrica [media 32,5 años (DE=12,9)]. Estos datos nos dicen que ellas probaron el alcohol más tarde y también comenzaron el consumo problemático a edades más avanzadas.

También se ven diferencias muy significativas (**p*<0,001) en los años de duración del consumo problemático, y en este caso también tenemos diferencias significativas (**p*<0,05) entre los dos grupos de comorbilidad psiquiátrica con trastornos no relacionados con sustancias. Los hombres con otra comorbilidad psiquiátrica llevan más años de enfermedad [media 15,3 años (DE=6,9)] con respecto a las mujeres con comorbilidad psiquiátrica [media 11,2 años (DE=6,3)] antes de buscar un tratamiento para el TUA. Por último, hay diferencias muy significativas (**p*<0,001) en el número de criterios de adicción del episodio de máxima severidad. Concretamente, encontramos diferencias muy significativas (**p*<0,001), entre el grupo de hombres con comorbilidad psiquiátrica y los hombres sin comorbilidad, en cuanto al

Tabla 1. Variables socio-demográficas en función del sexo de una población de consumidores de alcohol en tratamiento.

Variables		Total	Hombres	Mujeres	Valor p
Número de pacientes [N(%)]		162 (100)	122 (75,3)	40 (24,7)	-
Edad [media (DE)]		49,3 (8,1)	49,1 (8,5)	49,9 (6,9)	0,575 ¹
Índice de masa corporal [media (DE)]		26,2 (4,5)	26,8 (4,5)	24,1 (3,9)	<0,001 ¹
Estado civil [N(%)]	Soltero Casado Separado/Divorciado Viudo	47 (29,0) 60 (37,0) 51 (31,5) 4 (2,5)	34 (27,9) 50 (41,0) 37 (30,3) 1 (0,8)	13 (32,5) 10 (25,0) 14 (35,0) 3 (7,5)	<0,05 ²
Nivel educativo [N(%)]	Sin estudios Primaria Secundaria Universidad	4 (2,5) 53 (32,7) 83 (51,2) 22 (13,6)	3 (2,5) 45 (36,9) 60 (49,2) 14 (11,5)	1 (2,5) 8 (20,0) 23 (57,5) 8 (20,0)	0,200 ²
Situación laboral [N(%)]	Empleado Baja por enfermedad Desempleado/Invalidez Jubilación Labores domésticas	46 (28,4) 27 (16,7) 68 (42,0) 17 (10,5) 4 (2,5)	36 (29,5) 23 (18,9) 49 (40,2) 14 (11,5) -	10 (25,0) 4 (10,0) 19 (47,5) 3 (7,5) 4 (10,0)	0,466 ²
Antecedentes judiciales [N(%)]	Sí No	40 (24,7) 122 (75,3)	37 (30,3) 85 (69,7)	3 (7,5) 37 (92,5)	<0,01 ²
Otro problema médico [N(%)]	No Endocrino Circulatorio Digestivo Sistema nervioso	89 (54,9) 8 (4,9) 23 (14,2) 33 (20,4) 9 (5,6)	65 (53,3) 4 (3,3) 20 (16,4) 27 (22,1) 6 (4,9)	24 (60,0) 4 (10,0) 3 (7,5) 6 (15,0) 3 (7,5)	0,215 ²
Procedencia del paciente [N(%)]	Psiquiatría Digestivo/Medicina interna Centro de salud mental Otros	120 (74,1) 35 (21,6) 5 (3,1) 2 (1,2)	86 (70,5) 4 (3,3) 30 (24,6) 2 (0,16)	34 (85,0) 1 (2,5) 5 (12,5) -	0,192 ²
Tratamiento psiquiátrico inicial [N(%)]	<1 año 1-5 años 5-10 años >10 años	38 (23,5) 46 (28,4) 16 (9,9) 62 (38,3)	29 (23,8) 36 (29,5) 15 (12,3) 42 (34,4)	9 (22,5) 10 (25,0) 1 (2,5) 20 (50,0)	0,167 ²
Medicación psiquiátrica [N(%)]	Sí No	123 (75,9) 39 (24,1)	86 (70,5) 36 (29,5)	37 (92,5) 3 (7,5)	<0,01 ²
Antecedentes familiares con adicciones [N(%)]	Sí No	100 (61,7) 62 (38,3)	45 (36,9) 77 (63,1)	17 (42,5) 23 (57,5)	0,576 ²
Fumador [N(%)]	Sí Ex-fumador No	111 (68,5) 26 (16,0) 25 (15,4)	80 (65,6) 23 (18,9) 19 (15,6)	31 (77,5) 3 (7,5) 6 (15,0)	0,218 ²
Trastornos por uso de sustancias (TUS) [N(%)]	Solo TUA TUA + otros TUS	98 (60,4) 64 (39,6)	68 (55,7) 54 (44,3)	30 (75,0) 10 (25,0)	<0,05 ²
Otros trastornos de comorbilidad psiquiátrica* [N(%)]	Sí No	111 (68,5) 51 (31,5)	78 (63,9) 44 (36,1)	33 (82,5) 7 (17,5)	<0,05 ²

Nota. Abreviaturas: N=número de sujetos; DE=desviación estándar; TUA= trastornos por uso de alcohol; TUS= trastornos por uso de sustancias. Valor p es el nivel de significación calculado por: (¹) prueba T de Student y (²) prueba exacta de Fisher ó chi-cuadrado.
(*) Se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS)

número de criterios del episodio de máxima severidad. Estas diferencias también son muy significativas (*p<0,001) con respecto al género en la presencia de comorbilidad, donde los hombres también tienen más criterios [media 8,0 criterios (DE=2,3)] que las mujeres, al comparar los dos grupos de comorbilidad psiquiátrica.

Añadir que se vieron diferencias de género en la presencia de síntomas físicos graves de dependencia, de convulsiones y/o *delirium tremens*, con una prevalencia del 7,4% solo en hombres, sin que influya la presencia o no de otra comorbilidad psiquiátrica distinta al TUA.

Tabla 2. *Patrones de uso de alcohol en una población de consumidores de alcohol en tratamiento en función del sexo y el diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica a lo largo de la vida.*

Patrones de uso de alcohol	Total N=162	Hombres N=122		Mujeres N=40		Valor p
		Sin comorbilidad psiquiátrica*	Con comorbilidad psiquiátrica*	Sin comorbilidad psiquiátrica*	Con comorbilidad psiquiátrica*	
Edad primer consumo alcohol [media (DE)]	16,8 (4,2)	17,30 (5,4)	15,92 (3,6)	16,2 (2,4)	18,2 (3,2) bb	<0,01
Edad consumo problemático de alcohol [media (DE)]	28,5 (11,5)	29,32 (11,9)	25,73 (9,8)	34,4 (13,3)	32,5 (12,9) b	<0,05
Duración de consumo problemático (años) [media (DE)]	14,9 (7,8)	17,2 (9,1)	15,3 (6,9)	12,0 (8,2)	11,2 (6,3) b	<0,01
Periodos de abstinencia anteriores ** [media (DE)]	1,2 (1,1)	1,0 (0,9)	1,3 (1,2)	1,4 (1,3)	0,9 (1,0)	0,345
Duración de la última abstinencia (meses) [media (DE)]	11,4 (17,5)	6,4 (7,2)	13,0 (20,0)	9,6 (11,7)	12,0 (19,6)	0,584
Criterios de adicción en el episodio de máxima severidad [media (DE)]	7,1 (2,2)	6,4 (1,8)	8,0 (2,3) aaa	6,1 (1,1)	6,2 (1,9) bbb	<0,001

Nota. Abreviaturas: N=número de sujetos; DE=desviación estándar

Valor p es el nivel de significación calculado a partir del análisis de la varianza por rangos de Kruskal-Wallis

(aaa) p<0,001 comparado con el grupo "Hombres sin comorbilidad";

(b, bb, bbb) p<0,05, p<0,01 y p<0,001 comparado con el grupo "Hombres con comorbilidad". Calculados con la prueba post-test de Dunn

(*) Se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS)

(**) mínimo 6 meses de abstinencia

Tabla 3. *Diagnósticos de trastornos por uso de alcohol y otras sustancias (DSM-IV-TR) en función del género y diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica a lo largo de la vida en una población de consumidores de alcohol en tratamiento.*

Variable		Total N=162	Hombres N=122		Mujeres N=40		Valor p Género Comorbilidad
			Sin comorbilidad psiquiátrica*	Con comorbilidad psiquiátrica*	Sin comorbilidad psiquiátrica*	Con comorbilidad psiquiátrica*	
Alcohol [N (%)]	Abuso y/o Dependencia	162 (100)	44 (36,1)	78 (63,9)	7 (17,5)	33 (82,5)	-
Cocaína [N (%)]	Abuso y/o Dependencia	48 (29,6)	6 (14,3)	36 (85,7)	-	6 (100)	<0,001
Cannabis [N (%)]	Abuso y/o Dependencia	22 (13,6)	2 (11,1)	16 (88,9)	-	4 (100)	<0,05
Sedantes [N (%)]	Abuso y/o Dependencia	6 (3,7)	1 (25,0)	3 (75,0)	-	2 (100)	0,543
Otros estimulantes** [N (%)]	Abuso y/o Dependencia	7 (4,3)	2 (33,3)	4 (66,7)	-	1 (100)	0,627

Nota. Abreviaturas: N=número de sujetos; DE=desviación estándar.

Valor p es el nivel de significación calculado por prueba exacta de Fisher/chi-cuadrado agrupando los pacientes por género ó comorbilidad psiquiátrica.

Valor p es el nivel de significación calculado por prueba exacta de Fisher/chi-cuadrado agrupando los pacientes por género y comorbilidad.

(*) Se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS).

(**) Metanfetaminas y derivados.

Comorbilidad psiquiátrica TUS.

Abuso y dependencia de sustancias

En la Tabla 3 se recoge la comorbilidad TUS de la población estudiada, en relación a la comorbilidad psiquiátrica y al género. Se pueden apreciar diferencias significativas (*p<0,05) en los TUS de cocaína en relación con el géne-

ro, siendo este trastorno más prevalente entre los hombres. Encontramos diferencias muy significativas (*p<0,001) en la prevalencia de trastornos comórbidos en pacientes con TUS de cocaína, en comparación con los pacientes que no presentan TUS de cocaína. Se ven también diferencias significativas (*p<0,05) en relación al uso de cannabis, siendo ele-

Tabla 4. Descripción de la comorbilidad psiquiátrica (DSM-IV-TR) a lo largo de la vida en una población de consumidores de alcohol en tratamiento.

Variable		Total N=162	Hombres N=122	Mujeres N=40	Valor p
Comorbilidad psiquiátrica* [N (%)]	Algún trastorno psiquiátrico	111 (68,5)	78 (63,9)	33 (82,5)	<0,05
	TEA	74 (45,7)	47 (38,5)	27 (67,5)	<0,05
	TA	32 (19,8)	23 (18,9)	9 (22,5)	0,650
	Trastornos psicóticos	15 (9,3)	10 (8,2)	5 (12,5)	0,529
	TCA	2 (1,2)	-	2 (5,0)	0,060
	Trastornos de personalidad	39 (24,1)	28 (22,9)	11 (25,0)	0,670
	TDAH	46 (28,4)	37 (30,3)	9 (22,5)	0,421
Trastornos del estado de ánimo (TEA) [N (%)]	Primaria	30 (18,5)	19 (15,6)	11 (27,5)	0,516
	Inducida	32 (19,8)	22 (18,0)	10 (25,0)	
	Primaria+Inducida	12 (7,4)	6 (4,9)	6 (15,0)	
Trastornos de ansiedad (TA) [N (%)]	Primaria	19 (11,7)	12 (9,8)	7 (17,5)	0,422
	Inducida	11 (6,8)	9 (7,4)	2 (5,0)	
	Primaria+Inducida	2 (1,2)	2 (1,6)	-	
Trastornos psicóticos [N (%)]	Primaria	5 (3,1)	4 (3,3)	1 (2,5)	1,000
	Inducida	9 (5,6)	6 (4,9)	3 (7,5)	
	Primaria+Inducida	1 (0,6)	-	1 (2,5)	
Trastornos de la conducta alimentaria (TCA) [N (%)]	Anorexia	-	-	-	0,060
	Bulimia	2 (1,2)	-	2 (5,0)	
Trastorno conducta infancia [N (%)]		14 (8,6)	13 (10,7)	1 (2,5)	0,192
Trastornos de la personalidad [N (%)]	Trastorno antisocial	7 (4,3)	7 (5,7)	-	0,152
	Trastorno límite	24 (14,8)	15 (12,3)	9 (22,5)	
Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)** [N (%)]		24 (14,8)	19 (15,6)	5 (12,5)	0,799

Nota. Abreviaturas: N=número de sujetos; DE=desviación estándar

Valor p es el nivel de significación calculado por prueba exacta de Fisher/chi-cuadrado agrupando los pacientes por género

(*) Eje I=Trastornos clínicos [se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS)]; Eje II=Trastornos de personalidad

(**) Diagnóstico TDAH (WURS)

vada la prevalencias de TUS en cannabis en otros trastornos de comorbilidad psiquiátrica, sin que existan diferencias debidas al género. Los pacientes con TUA y comorbilidad TUS de cannabis y cocaína, tienen más prevalencia de presentar comorbilidad a otros trastornos no relacionados con sustancias, que los pacientes sin comorbilidad TUS.

Debemos decir que para el resto de otras sustancias estudiadas no se encuentran diferencias estadísticamente significativas inter grupos a lo largo de la vida.

Comorbilidad psiquiátrica de trastornos no relacionados con uso de sustancias

En la Tabla 4 se recogen los distintos diagnósticos excluyendo los trastornos relacionados con uso de sustancias que han presentado los pacientes, recogidos con los instrumentos de evaluación (PRISM y WURS) y diferen-

ciados por género. Encontramos diferencias estadísticamente significativas (* $p<0,05$) entre la prevalencia de trastornos psiquiátricos, con un 82,5% de mujeres frente a un 63,9% de hombres con un diagnóstico de trastorno mental distinto del adictivo. Se encuentran también diferencias muy significativas (* $p<0,01$) en la prevalencia de TEA en mujeres (67,5%) y hombres (38,5%). En los demás trastornos no encontramos diferencias significativas debidas al género.

Diferencias de género en comorbilidad psiquiátrica y por TUS

En este apartado (ver Tabla 5), queremos ver en detalle la distribución de trastornos psiquiátricos entre las diferencias existentes debidas al género y el tipo de TUS diagnosticado. Podemos decir que, cuando diferenciamos según las sustan-

Tabla 5. Descripción de la comorbilidad psiquiátrica (DSM-IV-TR) a lo largo de la vida en una población de consumidores de alcohol en tratamiento agrupada por género y diagnóstico de trastornos por uso de alcohol y de otras sustancias.

Variables	Total	Hombres N=122		Mujeres N=40		Valor p
		TUA + otra TUS	TUA	TUA + otra TUS	TUA	
Número de pacientes [N (%)]	162 (100)	53 (43,4)	69 (56,6)	10 (25,0)	30 (75,0)	<0,05
Comorbilidad psiquiátrica * [N (%)]	111 (68,5)	46 (37,7)	32 (26,2)	10 (25,0)	23 (57,5)	<0,01
Comorbilidad psiquiátrica (≥ dos diagnósticos) * [N (%)]	63 (38,9)	31 (25,4)	14 (11,5)	8 (20,0)	10 (25,0)	0,087
Trastornos del estado de ánimo (TEA) [N (%)]	74 (45,7)	24 (19,7)	23 (18,9)	8 (20,0)	19 (47,5)	<0,001
Trastornos de ansiedad (TA) [N (%)]	32 (19,8)	15 (12,3)	8 (6,5)	2 (5,0)	7 (17,5)	<0,05
Trastornos psicóticos [N (%)]	15 (9,3)	5 (4,1)	5 (4,1)	2 (5,0)	3 (7,5)	1,000
Trastornos de la conducta alimentaria (TCA) [N (%)]	2 (1,2)	-	-	2 (5,0)	-	-
Trastorno de la personalidad antisocial [N (%)]	11 (6,8)	9 (7,4)	1 (0,8)	1 (2,5)	-	-
Trastorno de la personalidad límite [N (%)]	28 (17,3)	13 (10,6)	5 (4,1)	7 (17,5)	3 (7,5)	1,000
Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) ** [N (%)]	46 (28,4)	28 (22,9)	9 (7,4)	4 (10)	5 (12,5)	0,106

Nota. Abreviaturas: N=número de sujetos; TUA=trastornos por uso de alcohol; TUS=trastornos por uso de otras sustancias
Valor p es el nivel de significación calculado por prueba exacta de Fisher/chi-cuadrado agrupando los pacientes por género y por diagnóstico de TUA y TUS
(*) Eje I=Trastornos clínicos [se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS)]; Eje II=Trastornos de personalidad.
(**) Diagnóstico TDAH (WURS)

cias, la comorbilidad psiquiátrica varía entre los que tienen solamente un trastorno de uso de alcohol (TUA), frente a los que además del TUA presentan otro TUS. En el caso de las mujeres con comorbilidad TUS, vemos como el 100% presentan además otros trastornos psiquiátricos a lo largo de la vida, siendo más prevalentes los TEA. Los hombres sin comorbilidad TUS (solo TUA), presentan menor prevalencia de otros trastornos psiquiátricos si los comparamos con aquellos que tienen comorbilidad TUS, y aunque estas diferencias no se aprecian en el diagnóstico de TEA, son muy marcadas en los trastornos de personalidad.

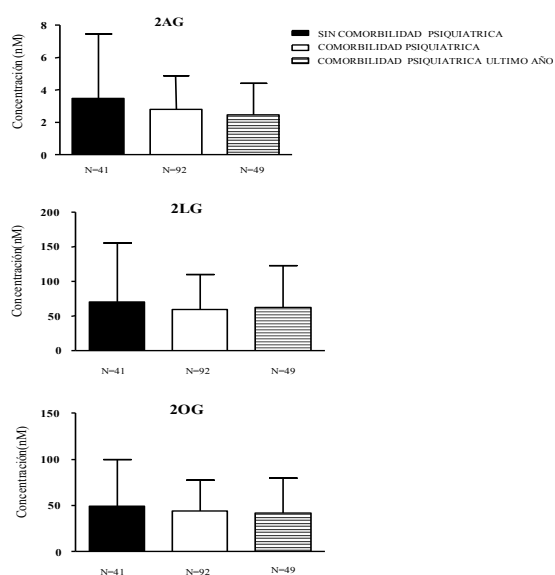
Hacemos una revisión especial al trastorno por déficit de atención e hiperactividad, por su estrecha relación con las sustancias depresoras y su alta prevalencia en TUS (Daigre et al., 2013; Polanczyk et al., 2014), en TUA, al igual que sucede en nuestros pacientes (Ponce et al., 2000).

Valores plasmáticos de 2-acilglicerol

Los niveles plasmáticos de 2-acilglicerol se ven reducidos en pacientes con comorbilidad psiquiátrica (excluyendo los TUS) sin que existan diferencias significativas entre los grupos respecto a la comorbilidad psiquiátrica. Hemos distinguido temporalidad entre los pacientes con comorbilidad psiquiátrica (a lo largo de la vida y en el último año) y comparado con pacientes sin comorbilidad psiquiátrica (Figura 1).

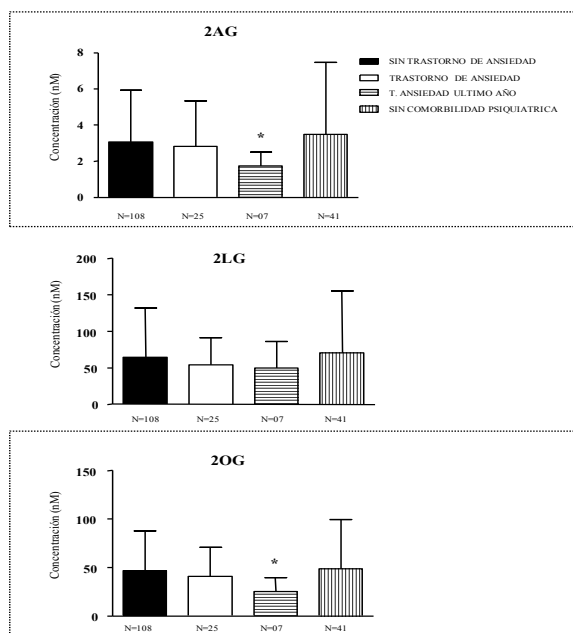
Los niveles plasmáticos de 2-AG y 2-OG están disminuidos significativamente (*p<0,05) en pacientes con diagnóstico de trastornos de ansiedad en el último año cuando comparamos sus concentraciones con pacientes con trastornos de ansiedad a lo largo de la vida, sin diagnósticos de trastornos de ansiedad y con pacientes sin comorbilidad psiquiátrica (Figura 2).

Comorbilidad psiquiátrica y valores plasmáticos de 2-acilglicerol en consumidores de alcohol en tratamiento ambulatorio.
Análisis de las diferencias de género



(#) Se excluyen los trastornos por uso de sustancias (TUS)

Figura 1. Niveles plasmáticos de 2-acilglicerol [2-araquidonilglicerol (2-AG), 2-linoleilglicerol (2-LG) y 2-oleoilglicerol (2-OG)] en consumidores de alcohol en tratamiento agrupados por comorbilidad psiquiátrica (#)



(*) $p < 0.05$ indica diferencias significativas respecto al grupo sin trastorno de ansiedad

Figura 2. Niveles plasmáticos de 2-acilglicerol [2-araquidonilglicerol (2-AG), 2-linoleilglicerol (2-LG) y 2-oleoilglicerol (2-OG)] en consumidores de alcohol en tratamiento agrupados por diagnósticos de trastornos de ansiedad (DSM-IV-TR).

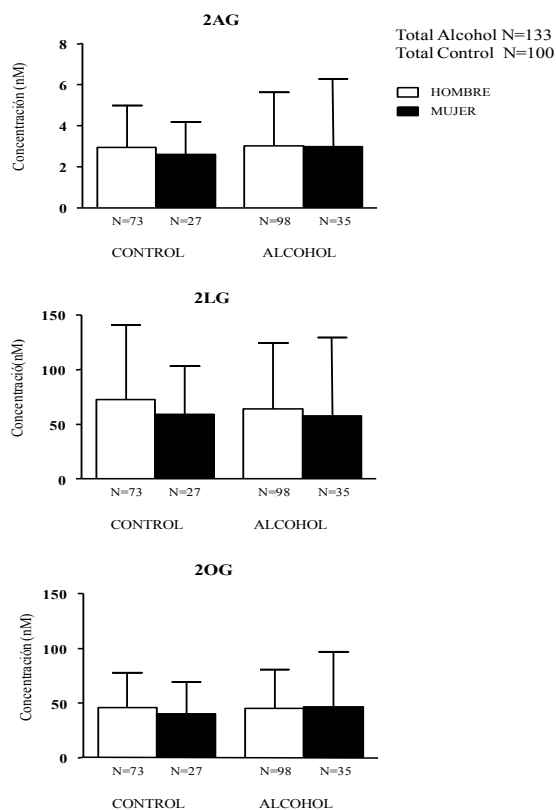


Figura 3. Niveles plasmáticos de 2-acilglicerol [2-araquidonilglicerol (2-AG), 2-linoleilglicerol (2-LG) y 2-oleoilglicerol (2-OG)] en consumidores de alcohol en tratamiento agrupado por sexo y comparado con población control.

Los niveles de 2-acilglicerol no muestran diferencias significativas respecto al sexo cuando comparamos la muestra de pacientes con TUA con un grupo control (Figura 3).

Discusión

Los resultados del presente estudio indican que los pacientes que solicitan tratamiento presentan una mayor comorbilidad psiquiátrica y que en algunos casos, en especial en relación con los trastornos de ansiedad, esta se refleja en niveles alterados de 2-acilglicerol. La prevalencia de comorbilidad psiquiátrica de este estudio a lo largo de la vida ha sido alta (68,5%) en un rango similar a algunos estudios realizados sobre distintos tipos de muestra con TUA y otras patologías, con 60-70% de comorbilidad psiquiátrica (Pérez-Gálvez et al., 2008; Driessen et al., 1998). Nuestro per-

fil de paciente es principalmente masculino, con un nivel educativo medio-bajo, de edad media 49,27 años y un alto grado de desempleo. Población en la que se excluyen los casos de diagnóstico con trastorno mental grave pero no las patologías orgánicas. Estas características pueden suponer una serie de sesgos que hay que tener en cuenta a la hora de comparar nuestros datos con otras poblaciones con TUA.

Existen diferencias importantes de género dentro del TUA. Sería interesante destacar que aunque las mujeres comienzan a beber a edades más avanzadas que los hombres, tardan menos tiempo que ellos en desarrollar criterios de dependencia al alcohol y cumplen menos criterios de severidad que los hombres. Estos datos se asemejan a los encontrados en la bibliografía, donde las mujeres tienen un patrón de consumo intenso, con un progreso más rápido desde el inicio del consumo hasta la dependencia. Este patrón podría ser la causa de que tengan mayor prevalencia de problemas médicos concomitantes en comparación con los hombres con TUA (Ávila Escribano et al., 2007; Keyes et al., 2010). También se aprecian diferencias de género en los trastornos no relacionados con sustancias, donde ellos tienen mayores prevalencias. El trastorno antisocial de la personalidad es diagnosticado tres veces más en hombres que en mujeres (Alegría et al., 2013). Las mujeres tienen mayores prevalencias en los trastornos depresivos (Ávila Escribano et al., 2007). La falta de apoyo social en las mujeres y los problemas interpersonales en el contexto familiar, serían factores de riesgo y posible causa de las diferencias de género en la comorbilidad psiquiátrica (Alegría et al., 2013).

En el análisis de la población con respecto a la comorbilidad debida a un TUS, encontramos que el policonsumo podría estar relacionado con la comorbilidad psiquiátrica, especialmente cuando el TUA va acompañado de otros TUS de sustancias como cocaína y cannabis. Sabemos que los TUS por cocaína están asociados a una elevada prevalencia de comorbilidad psiquiátrica (Araos et al., 2014) y además encontramos en la literatura una elevada prevalencia de policonsumo en pacientes en seguimiento que son mayoritariamente hombres jóvenes, nunca casados, con una edad temprana de inicio del consumo y comorbilidad psiquiátrica (Blanco et al., 2015). Si analizamos la comorbilidad psiquiátrica en nuestra muestra encontramos que, primero, los trastornos de estado de ánimo primarios y los inducidos tuvieron similar prevalencia a lo largo de la vida. Sabemos que la depresión que comienza antes del inicio del TUS reduce las posibilidades de remisión de la dependencia, al igual que lo hacen las depresiones mayores inducidas (Samet et al., 2013). Algunos estudios aseguran que el grado de severidad del TUS es un buen predictor de trastornos depresivos en el seguimiento del paciente (Boschloo et al., 2012), esta afirmación tiene sentido en nuestra muestra al ver relación entre presencia de comorbilidad psiquiátrica y severidad de criterios de adicción en TUA. Segundo, respecto a los trastornos de ansiedad, en nuestro estudio fueron

más prevalentes los trastornos primarios que los inducidos para los diagnósticos a lo largo de la vida. Tercero, los trastornos psicóticos en nuestra muestra, son mayoritariamente inducidos aunque distan mucho de los encontrados en otras poblaciones, en la que las prevalencias fueron elevadas (15,5%) (Araos et al., 2014). Aunque los trastornos del estado de ánimo y de ansiedad primarios son mayoritariamente más frecuentes que los inducidos por sustancias (Torrens et al., 2011), nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados mediante la evaluación PRISM en poblaciones con TUS por cocaína, donde los trastornos inducidos fueron más prevalentes que los primarios (Araos et al., 2014; Vergara-Moragues et al., 2012). Por último, sobre los TP, existe una prevalencia del trastorno antisocial de la personalidad de 6,8% y un 17,4% de trastorno límite de la personalidad en nuestra población, prevalencias más bajas que las encontradas en poblaciones con TUS de otras sustancias como cocaína (Araos et al., 2014). Hay evidencias que sugieren que los trastornos de personalidad se asocian más a otros TUS, por ser el consumo de estas las que aumentan los problemas conductuales, la severidad clínica y las dificultades sociales (Salom et al., 2014).

El diagnóstico de TDAH tienen una prevalencia del 7% en la infancia y de ellos aproximadamente el 4% prevalece en la edad adulta (Kessler et al., 2006). Nuestra población tiene una elevada prevalencia en este trastorno, en estos resultados puede influir la utilización de un instrumento específico para su diagnóstico. Aun así, los síntomas en el adulto pueden dar lugar a errores, como que la inquietud se interprete como ansiedad o la distraibilidad por falta de interés o motivación (Quintero et al., 2013). El hecho de tener comorbilidad TUS aumenta la comorbilidad psiquiátrica de la muestra (Tómasson y Vaglum, 1995). En nuestra muestra, cuando eliminamos la presencia de otros TUS en los pacientes con TUA, la prevalencia de otra comorbilidad psiquiátrica se reduce (de 82,5% a 57,5% en mujeres y de 63,9% a 26,2% en hombres). Disminuye también la prevalencia de trastornos de personalidad, porque el trastorno antisocial en hombres sin comorbilidad TUS baja a 0,8% y el trastorno límite en mujeres al 7,5%. Obtenemos cifras que concuerdan con estudios descritos en poblaciones similares en nuestro país, en el que el trastorno antisocial tendría prevalencias del 2% y el trastorno límite de la personalidad 6% (Fernández-Montalvo et al., 2006). Estos pacientes experimentan dificultades de comportamiento tanto internos como externos en comparación con lo que solo cursan TUA (Salom et al., 2014).

Los resultados sobre comorbilidad psiquiátrica arriba descritos apoyan la necesidad de buscar pruebas biológicas objetivas que sirvieran como biomarcadores específicos de subgrupos con comorbilidades psiquiátricas específicas. A este respecto, nuestro estudio aporta la descripción por primera vez de los valores plasmáticos 2-acilgliceroles en estos pacientes. Los datos sugieren que el 2-AG y 2-OG están

afectados por diagnósticos de trastornos de ansiedad en el último año. La señalización endocannabinoides se ha implicado en la modulación de la ansiedad y la respuesta emocional (Navarro et al., 1997). Un incremento de la liberación de endocannabinoides se asocia a efecto ansiolítico, lo que ha motivado el desarrollo de múltiples fármacos, especialmente aquellos relacionados con el bloqueo de la actividad de las enzimas degradadoras de endocannabinoides FAAH y MAGL (Gaetani et al., 2003; Kinsey et al., 2011). Encontramos estudios que relacionan la disregulación de acilglicérols con la dificultad de adaptación a estímulos estresantes y aversivos con un aumento de respuestas de estrés, ansiedad y miedo (Guggenhuber et al., 2015; Jenniches et al., 2015). El hecho de que nosotros encontremos también una relación entre cambios en 2- acilglicérols y los diagnósticos de trastornos de ansiedad, nos sitúa más cerca de posibles dianas terapéuticas de estrés y trastornos relacionados con la ansiedad.

Entre nuestras limitaciones hay que destacar que la evaluación retrospectiva de la sintomatología clínica y de abstinencia es imperfecta, así como los periodos de esta última relatados por los pacientes. Por otro lado, el tamaño de la muestra, relativamente pequeño desde una perspectiva estadística, aunque relevante desde un punto de vista clínico, así como el porcentaje de población femenina estudiado.

Las perspectivas futuras a considerar pasan por continuar con este tipo de estudios de caracterización fenotípica con una muestra más amplia y representativa. Desarrollar un trabajo longitudinal que permita comprobar la evolución de los síntomas psicopatológicos y de severidad en la adicción y ampliar la búsqueda de población femenina que cumpla criterios de inclusión con la finalidad de hacer comparaciones de género más profundas y diseñar tratamientos de atención especializada, la necesidad de incorporar y aumentar la muestra de distintos biomarcadores de diagnóstico en consumo, severidad y comorbilidad en la realización de mejoras en pronóstico y tratamientos óptimos adaptados a las necesidades de cada perfil de paciente.

Reconocimientos

A cada paciente que participó en el estudio, por su tiempo y esfuerzo. Agradecer también al servicio de psiquiatría del 12 de Octubre de Madrid su colaboración, especial dedicación y profesionalidad a todos ellos, médicos, enfermeras, técnico de laboratorio y administrativos.

El presente estudio ha sido financiado por Instituto de Salud Carlos III (ISC-III), Red de Trastornos Adictivos UE-FEDER 2012 (RD12/0028); Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/02261); Plan Nacional sobre Drogas 049/2009 y 049/2013; Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía UE-FEDER (CTS-433); Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía

(PI0228-2013 y PI0823-2012). Contratos “Miguel Servet” del Instituto de Salud Carlos III y Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER/EU-ERDF (CP14/00212 y CP14/00173). Contrato “Río Hortega” del Instituto de Salud Carlos III (CM13/0115).

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

Referencias

- Alegría, A. A., Blanco, C., Petry, N. M., Skodol, A. E., Liu, S. M., Grant, B. y Hasin, D. (2013). Sex differences in antisocial personality disorder: results from the national epidemiological survey on alcohol and related conditions. *Personal Disorders*, 4, 214-222. doi: 10.1037/a0031681.
- Araos, P., Vergara-Moragues, E., Pedraz, M., Pavón, F.J., Campos, R., Calado, M.,... Rodríguez de Fonseca, F. (2014). Comorbilidad psicopatológica en consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio. *Adicciones*, 26, 15-26.
- Ávila Escribano, J. J. y González Parra, D. (2007). Gender differences in alcoholism. *Adicciones*, 19, 383-392.
- Basavarajappa, B. S. y Hungrund, B. L. (2005). Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol. *Alcohol and Alcoholism*, 40, 15-24.
- Blanco, C., Iza, M., Rodríguez-Fernández, J. M., Baca-García, E., Wang, S. y Olfson, M. (2015). Probability and predictors of treatment-seeking for substance use disorders in the U.S. *Drug and Alcohol Dependence*, 149, 136-144. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.031.
- Caillé, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D. G. y Parsons, L. H. (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *The Journal of Neuroscience*, 27, 3695-3702.
- Boschloo, L., Van den Brink, W., Penninx, B. W. J. H., Wall, M. M. y Hasin, D. S. (2012). Alcohol-use disorder severity predicts first-incidence of depressive disorders. *Psychological Medicine*, 42, 695-703. doi: 10.1017/S0033291711001681.
- Driessen, M., Veltrup, C., Wetterling, T., John, U. y Dilling, H. (1998). Axis I and Axis II comorbidity in alcohol dependence and the two types of alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 77-86.
- Daigre, C., Terán, A., García-Vicent, V. y Roncero, C. (2013). Trastorno por déficit de atención con hiperactividad y dependencia de sustancias depresoras. *Adicciones*, 25, 171-186.
- Engelhard, C. P., Touquet, G., Tansens, A. y De Fruyt, J. (2015). [Alcohol-induced psychotic disorder: a systematic literature review]. *Tijdschrift voor Psychiatrie*, 57, 192-201.
- Fernández-Montalvo, J., Landa, N., López-Goñi, J. J. y Lorea, I. (2006). Personality disorders in alcoholics: A

- comparative pilot study between the IPDE and the MC-MI-II. *Addictive Behaviors*, 31, 1442-1448.
- Fiedler, K. K., Kim, N., Kondo, D. G. y Renshaw, P. F. (2012). Cocaine use in the past year is associated with altitude of residence. *Journal of Addiction Medicine*, 6, 166-171. doi: 10.1097/ADM.0b013e31824b6c62.
- Flensburg-Madsen, T., Knop, J., Mortensen, E. L., Becker, U., Sher, L. y Gronbaek, M. (2009). Alcohol use disorders increase the risk of completed suicide-irrespective of other psychiatric disorders. A longitudinal cohort study. *Psychiatry Research*, 167, 123-130. doi: 10.1016/j.psychres.2008.01.008.
- Gaetani, S., Cuomo, V. y Piomelli, D. (2003). Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs?. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 478-478.
- Grant, B. F., Stinson, F. S., Dawson, D. A., Chou, S. P., Ruan, W. J. y Pickering, R. P. (2004). Co-occurrence of 12-Month Alcohol and Drug Use Disorders and Personality Disorders in the United States: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Archives of General Psychiatry*, 61, 361-368.
- Goldsmith, R. J. (1999). Overview of psychiatric comorbidity: practical and theoretic considerations. *Psychiatric Clinics of North America*, 22, 331-349.
- Guggenhuber, S., Romo-Parra, H., Bindila, L., Leschik, J., Lomazzo, E., Remmers, F.,... Lutz, B. (2015). Impaired 2-AG signaling in hippocampal glutamatergic neurons: aggravation of anxiety-like behavior and unaltered seizure susceptibility. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, pyv091. doi: 10.1093/ijnp/pyv091.
- Hasin, D. S., Trautman, K. D., Miele, G. M., Samet, S., Smith, M. y Endicott, J. (1996). Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): Reliability for substance abusers. *American Journal of Psychiatry*, 153, 1195-1201.
- Hasin, D. S., Goodwin, R. D., Stinson, F. S. y Grant, B. F. (2005). Epidemiology of Major Depressive Disorder: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Archives of General Psychiatry*, 62, 1097-1106.
- Hasin, D. S., Stinson, F. S., Ogburn, E. y Grant, B. F. (2007). Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Archives of General Psychiatry*, 64, 830-842.
- Jenniches, I., Ternes, S., Albayram, O., Otte, D. M., Bach, K., Bindila, L.,... Zimmer, A. (2015). Anxiety, stress and fear response in mice with reduced endocannabinoid levels. *Biological Psychiatry*. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.03.033.
- Karila, L., Petit, A., Lowenstein, W. y Reynaud, M. (2012). Diagnosis and consequences of cocaine addiction. *Current Medical Chemistry*, 19, 5612-5618.
- Karila, L., Zarmidini, R., Petit, A., Lafaye, G., Lowenstein, W. y Reynaud, M. (2014). Cocaine addiction: Current data for clinician. *Presse Medicale* 43, 9-17.
- Kessler, R. C., Crum, R. M., Warner, L. A., Nelson, C. B., Schulenberg, J. y Anthony, J. C. (1997). Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. *Archives of General Psychiatry*, 54, 313-321.
- Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Delmer, O.,... Zaslavsky, A. M. (2006). The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States: Results From the National Comorbidity Survey Replication. *American Journal of Psychiatry*, 163, 716-723.
- Kessler, R. C. y Ustün, T. B. (2004). The word mental health (WMH) survey initiative version of the world health organization (WHO) composite international diagnostic interview (CIDI). *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 13, 93-121.
- Keyes, K. M., Martins, S. S., Blanco, C. y Hasin D. S. (2010). Telescoping and gender differences in alcohol dependence: new evidence from two national surveys. *American Journal of Psychiatry*, 167, 969-976. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.09081161.
- Kinsey, S. G., O'Neal, S. T., Long, J. Z., Cravatt, B. F. y Lichtman, A. H. (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like in the marble burying assay. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98, 21-27. doi: 10.1016/j.pbb.2010.12.002.
- Malinen, H., Lehtonen, M. y Hyttiä, P. (2009). Modulation of brain endocannabinoid levels by voluntary alcohol consumption in alcohol-preferring AA rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33, 1711-1720. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01008.x.
- Morguello, S., Holzer, C.E., Ryan, E., Young, C., Naseer, M., Castellon, S. A.,... Singer, E. J. (2006). Interrater reliability of the Psychiatric Research Interview for Substance and mental Disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS Tissue Consortium. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 15, 131-138.
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R. M., del Arco, I., Villanúa, M. A., Carrera, M. R. y Rodríguez de Fonseca, F. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*, 8, 491-496.
- Observatorio Español sobre Drogas (2013). Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2011-2012.
- Pavón, F. J., Araos, P., Pastor, A., Calado, M., Pedraz, M., Campos-Cloute, R.,... Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addiction Biology*, 18, 955-969. doi: 10.1111/adb.12107.

- Pedraz, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J.,... Pavón, F.J. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Frontiers in Psychiatry*, 16, 6-17. doi: 10.3389/fpsyt.2015.00017.
- Pérez-Gálvez, B., de Vicente-Manzanaro, M. P., García-Fernández, L., Romero-Escobar, C. y Oliveras-Valenzuela, M. A. (2008). Prevalencia de psicopatología en dependientes al alcohol en tratamiento ambulatorio. *Trastornos Adictivos*, 10, 42-48.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 873-884.
- Polanczyk, G. V., Willcutt, E. G., Salum, G. A., Kieling, C. y Rohde, L. A. (2014). ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *International Journal of Epidemiology*, 43, 434-442. doi: 10.1093/ije/dyt261.
- Ponce, G., Rodríguez-Jiménez, R., Rojo, J.A., Sánchez-Monazor, R. y Rubio, G. (2000). Attention-deficit hyperactivity disorder and vulnerability to the development of alcoholism: use of the Wender-Utah Rating Scale for retrospective diagnosis of ADHD in the childhood of alcoholic patients. *Actas Españolas de Psiquiatría*, 28, 357-366.
- Quintero, J., Balanzá-Martínez, V., Correas, J. y Soler, B. (2013). Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in the adult patients: view of the clinician. *Actas Españolas de Psiquiatría*, 41, 185-195.
- Robins, L. N., Wing, J., Wittchen, H. U., Helzer, J. E., Babor, T. F., Burke, J.,... Towle, L. H. (1988). The Composite International Diagnostic Interview: an epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Archives of General Psychiatry*, 45, 1069-1077.
- Rodríguez-Jiménez, R., Ponce, G., Monazor, R., Jiménez-Giménez, M., Pérez-Rojo, J.A. y Rubio, G. (2001). Validación en población española adulta de la Wender-Utah Rating Scale para la evaluación retrospectiva de trastorno por déficit de atención e hiperactividad en la infancia. *Revista de Neurología*, 33, 44.
- Rodríguez-Jiménez, R., Aragües, M., Jiménez-Arriero, M. A., Ponce, G., Muñoz, A., Bagney, A.,... Palomo, T. (2008). Dual diagnosis in psychiatric inpatients: prevalence and general characteristics. *Investigación Clínica*, 49, 195-205.
- Ross, H. E. (1995). DSM-III-R alcohol abuse and dependence and psychiatric comorbidity in Ontario: results from the Mental Health Supplement to the Ontario Health Survey. *Drug and Alcohol Dependence*, 39, 111-128.
- Ruffles, G. (2009). Emergency care for young people who have used cocaine. *Emergency Nurse*, 17, 34-36. doi: <http://dx.doi.org/10.7748/en2009.12.17.8.34.c7433>
- Salom, C. L., Betts, K. S., Williams, G. N., Najman, J. N., Scott, J. G. y Alati, R. (2014). Do young people with comorbid mental and alcohol disorders experience worse behavioral problems?. *Psychiatry Research*. 219, 372-379. doi: 10.1016/j.psychres.2014.05.056.
- Samet, S., Fenton, M., Nunes, E., Greenstein, E., Aharonovich, E. y Hasin, D. (2013). Effects of independent and substance-induced major depressive disorder on remission and relapse of alcohol, cocaine and heroin dependence. *Addiction*, 108, 115-123. doi: 10.1111/j.1360-0443.2012.04010.x.
- Serrano, A., Rivera, P., Pavón, F.J., Decara, J., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca F. y Parsons L. H. (2012). Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36, 984-994. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01686.x.
- Tómasson, K. y Vaglum, P. (1995). A nationwide representative sample of treatment seeking alcoholics: A study of psychiatric comorbidity. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 92, 378-385.
- Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Pérez-Domínguez, G. y Martín-Santos, R. (2004). Diagnosis comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *American Journal Psychiatry*, 161, 1231-1237.
- Torrens, M., Gilchrist, G., y Domingo-Salvany, A. y psyCo-Barcelona Group (2011). Psychiatric comorbidity in illicit drug users: Substance-induced versus independent disorders. *Drug and Alcohol Dependence*. 133, 147-156. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2010.07.013.
- Vergara-Moragues, E., González-Saiz, F., Lozano, O. M., Betanzos Espinosa, P., Fernández Calderón, F., Bilbao-Acebos, I.,... Verdejo García, A. (2012). Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community. Substance induced versus independent disorders. *Psychiatry Research*, 200, 734-741. doi: 10.1016/j.psychres.2012.07.043.
- World Health Organization (2014). *Global status report on alcohol and health-2014*. World Health Organization.

Estudio II

Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence.

Nuria Garcia-Marchena^{1*}, Francisco J. Pavon^{1*}, Antoni Pastor^{2,3,4}, Pedro Araos¹, Maria Pedraz¹, Pablo Romero-Sanchiz¹, Montserrat Calado¹, Juan Suarez¹, Estela Castilla-Ortega¹, Laura Orio⁵, Anna Boronat^{2,3,4}, Marta Torrens^{6,7,8}, Gabriel Rubio^{9,10}, Rafael de la Torre^{2,4,11}, Fernando Rodríguez de Fonseca¹ and Antonia Serrano¹.

¹ Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain; ² Grup de Recerca en Farmacologia Integrada i Neurociencia de Sistemes, Programa de Recerca en Neurociencia, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Spain; ³ Department de Farmacologia, Toxicologia i Terapeutica, Facultat de Medicina, Universitat Autonoma de Barcelona, Spain; ⁴ CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutricion (CIBERObn), ISCIII, Spain; ⁵ Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Spain; ⁶ Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions (INAD) del Parc de Salut MAR, Spain; ⁷ IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; ⁸ Department of Psychiatry, Univ Autonoma de Barcelona, Spain; ⁹ Departamento de Psiquiatria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Spain; ¹⁰ Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Spain; ¹¹ Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Spain.

Publicado en:



Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence

Publicado en:

Nuria Garcia-Marchena^{1*}, Francisco J. Pavon^{1*}, Antoni Pastor^{2,3,4}, Pedro Araos¹, Maria Pedraz¹, Pablo Romero-Sanchiz¹, Montserrat Calado¹, Juan Suarez¹, Estela Castilla-Ortega¹, Laura Orio⁵, Anna Boronat^{2,3,4}, Marta Torrens^{6,7,8}, Gabriel Rubio^{9,10}, Rafael de la Torre^{2,4,11}, Fernando Rodriguez deFonseca¹ & Antonia Serrano¹

Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain¹, Grup de Recerca en Farmacologia Integrada i Neurociencia de Sistemes, Programa de Recerca en Neurociencia, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Spain², Department de Farmacologia, Toxicologia i Terapeutica, Facultat de Medicina, Universitat Autonoma de Barcelona, Spain³, CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutricion (CIBEROBn), ISCIII, Spain⁴, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Spain⁵, Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions (INAD) del Parc de Salut MAR, Spain⁶, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain⁷, Department of Psychiatry, Univ Autonoma de Barcelona, Spain⁸, Departamento de Psiquiatria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Spain⁹, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Spain¹⁰ and Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Spain¹¹

ABSTRACT

Acylethanolamides are a family of endogenous lipid mediators that are involved in physiological and behavioral processes associated with addiction. Recently, oleoylethanolamide (OEA) has been reported to reduce alcohol intake and relapse in rodents but the contribution of OEA and other acylethanolamides in alcohol addiction in humans is unknown. The present study is aimed to characterize the plasma acylethanolamides in alcohol dependence. Seventy-nine abstinent alcohol-dependent subjects (27 women) recruited from outpatient treatment programs and age-/sex-/body mass-matched healthy volunteers (28 women) were clinically assessed with the diagnostic interview PRISM according to the DSM-IV-TR after blood extraction for quantification of acylethanolamide concentrations in the plasma. Our results indicate that all acylethanolamides were significantly increased in alcohol-dependent patients compared with control subjects ($p < 0.001$). A logistic model based on these acylethanolamides was developed to distinguish alcohol-dependent patients from controls and included OEA, arachidonoyl ethanolamide (AEA) and docosatetraenoyl ethanolamide (DEA), providing a high discriminatory power according to area under the curve [AUC = 0.92 (95%CI: 0.87–0.96), $p < 0.001$]. Additionally, we found a significant effect of the duration of alcohol abstinence on the concentrations of OEA, AEA and DEA using a regression model ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), which was confirmed by a negative correlation ($\rho = -0.31$, -0.40 and -0.44 , respectively). However, acylethanolamides were not influenced by the addiction alcohol severity, duration of problematic alcohol use or diagnosis of psychiatric comorbidity. Our results support the preclinical studies and suggest that OEA, AEA and DEA are altered in alcohol-dependence during abstinence and that might act as potential markers for predicting length of alcohol abstinence.

Keywords abstinence, acylethanolamides, alcohol use disorder, DSM-IV-TR, oleoylethanolamide, psychiatric comorbidity.

Correspondence to: Antonia Serrano and Fernando Rodríguez de Fonseca, Laboratorio de Medicina Regenerativa, Hospital Regional Universitario de Málaga, Avda. Carlos Haya 82, sótano. Málaga, 29010, Spain. E-mail: antonia.serrano@ibima.eu, fernando.rodriguez@ibima.eu

INTRODUCTION

Alcohol consumption is considered a major risk factor for disease and mortality worldwide (WHO 2014). Health

problems associated with a harmful alcohol use include many diseases ranging from liver diseases to neuropsychiatric disorders. Although the general population drinks alcohol in moderate doses, there is a high prevalence of

*These authors contributed equally to this study

alcohol abuse and alcohol use disorder, and it is crucial the development of new strategies for alleviate the burden of alcohol-derived harms on society.

Oleoylethanolamide (OEA) is a satiety factor belonging to the acylethanolamide family. This family includes a number of structurally related compounds derived from saturated and unsaturated fatty acids involved in a wide range of physiological activities. Together with OEA, arachidonoyl ethanolamide (AEA) is the best characterized acylethanolamide. These endogenous lipid mediators share common biosynthetic and degradative pathways (Di Marzo 2011), which can be targeted by drugs of abuse (Orio *et al.* 2013). While OEA activates with high potency the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) (Fu *et al.* 2003), AEA is a partial agonist at cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂) and represents one of the best characterized endocannabinoids (Di Marzo 1998). In addition to their interaction with nuclear transcription factors and cannabinoid receptors, acylethanolamides have been found to modulate other targets, such as the transient receptor potential vanilloid type-1 or the orphan G-protein coupled receptors GPR119 and GPR55 (Zygmunt *et al.* 1999; Ahern 2003; Overton *et al.* 2006; Brown 2007).

Over the last years, numerous studies have reported a prominent role of OEA in the regulation of energy expenditure and fat utilization [for review, see (Pavón 2010)]. Besides this homeostatic role in metabolism balance, a growing body of evidence points to the involvement of OEA as well as other acylethanolamides in the effects produced by several classes of abused drugs such as nicotine, psychostimulants or alcohol. It has been reported that OEA is able to modulate nicotine self-administration and relapse through a PPAR- α -dependent mechanism (Mascia *et al.* 2011). OEA also plays a role in cocaine addiction, attenuating cocaine-induced behaviors related to sensitization, reinforcement and drug-seeking in mice (Bilbao *et al.* 2013). With regard to alcohol, several studies implicate acylethanolamide signaling on ethanol-related behaviors. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that alcohol exposure is associated with an increased formation of AEA (Basavarajappa & Hungund 1999; Gonzalez *et al.* 2002; Basavarajappa *et al.* 2003; Gonzalez *et al.* 2004). Recently, our group has reported a role for OEA in the regulation of multiple aspects of the physiological adaptations to alcohol exposure in animal models (Bilbao *et al.* 2015). This study demonstrates that alcohol exposure is associated with an increase in the production of OEA that contributes to the regulation of several behavioral effects of alcohol, including the alcohol consumption and the reduction of the severity of alcohol withdrawal symptoms. In addition to these preclinical observations, human genetic reports also describe a significant association between alcohol use disorder and polymorphisms and/or mutation of the gene encoding

the fatty acid amide hydrolase (FAAH), the primary enzyme responsible for the degradation of the acylethanolamides (Sipe *et al.* 2002). In the last years, very few clinical studies have evaluated the plasma profile of acylethanolamides and related congeners in individuals with substance use disorders (Potvin *et al.* 2008; Mangieri *et al.* 2009; Desfosses *et al.* 2012; Feurecker *et al.* 2012; Pavon *et al.* 2013) or reward deficit associated with excessive fat intake (Tellez *et al.* 2013). Recently, our group has determined the plasma profile of fatty acid derivatives in abstinent cocaine users reporting a robust increase in the plasma concentration of acylethanolamides, including OEA and AEA but also other less known acylethanolamides such as palmitoleoyl ethanolamide (POEA), linoleoyl ethanolamide (LEA), docosahexaenoyl ethanolamide (DHEA), dihomogamma-linolenoyl ethanolamide (DGLA) and docosatetraenoyl ethanolamide (DEA) (Pavon *et al.* 2013). Additionally, OEA concentrations are altered in cocaine users diagnosed with mood disorders. An interesting link has been established between OEA and reward sensitivity in obese patients, demonstrating a role for OEA in regulating natural reward processing (Grosshans *et al.* 2014). Thus, OEA and related bioactive lipids arise as a relevant signal mediating natural and drug-induced reward.

Because there is considerable experimental evidence pointing to a major role of OEA in mediating ethanol effects, the main goal of the present study was to evaluate the plasma concentrations of OEA and related acylethanolamides in a cohort of alcohol-dependent patients in abstinence with no other substance use disorders who were clinically characterized. Variables related to alcohol use disorder such as the duration of problematic alcohol use, abstinence length, alcohol addiction severity and psychiatric comorbidity were also examined in relation to these lipid mediators.

METHODS AND MATERIALS

Participants and recruitment

The initial sample included 233 participants (Caucasian race) divided into two groups: abstinent alcohol-dependent patients recruited from an outpatient alcohol program in *Hospital Universitario 12 de Octubre* (Madrid, Spain) and a control group recruited from a multidisciplinary staff working at the *Hospital Regional Universitario de Malaga* (Malaga, Spain), *Hospital Universitario 12 de Octubre* and *Universidad Complutense de Madrid* (Madrid, Spain). However, to avoid interference by the presence of other drugs of abuse in this study, one of the exclusion criteria was the diagnosis of other substance use disorders in the alcohol group. The definitive sample included 79 alcohol-dependent subjects meeting criteria for alcohol use disorder according to the 'Diagnostic and

Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision' (DSM-IV-TR), and 79 healthy individuals with no history of drug abuse. These participants were matched with the alcohol group for age, sex and body mass index (BMI).

To be eligible for the study, subjects had to be ≥ 18 years to 65 years of age. Exclusion criteria included: (1) other substance use disorders; (2) the presence of infectious diseases; (3) the diagnosis of incapacitating cognitive alterations and/or severe schizophrenia; and (4) pregnancy for female participants. Alcohol-dependent subjects were required to be abstinent for at least 4 weeks before testing to avoid acute effects in our results. A breathalyzer kit was used to check the alcohol abstinence weekly. Subsequently, plasma analyses were conducted to verify alcohol abstinence.

All abstinent alcohol-dependent patients were under current treatment intervention, including pharmacological and psychosocial techniques.

Clinical assessment

Alcohol-dependent patients were evaluated according to DSM-IV-TR criteria, using the Spanish version of the 'Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases' (PRISM) (Hasin *et al.* 1996; Torrens *et al.* 2004).

The semi-structured interview PRISM is designed expressly for assessing comorbid psychiatric disorders in individuals who abuse substances identifying primary and substance-induced disorders in the last 12 months and previously (Hasin 2012; Hasin *et al.* 2013). Also, PRISM establishes the pattern of substance use from pathological uses (chronic intoxication and binge use) to substance use disorders (abuse and dependence). The substance use assessment also includes information related to age of onset, periods of abstinence or length of the last abstinence (Hasin *et al.* 1996).

The four criteria for abuse (one symptom is necessary for a diagnosis of abuse) and seven criteria for dependence (three or more co-occurring symptoms in a 12-month period are required) according to DSM-IV-TR were used as an one-dimensional score for alcohol addiction severity, which is in agreement with the new DSM-5 criteria [See for more details (Pavon *et al.* 2013; Araos *et al.* 2015)].

Control subjects were evaluated using the Spanish version of the 'Composite International Diagnostic Interview' (CIDI) for the detection of psychiatric disorders (Robins *et al.* 1988) and with the 'Alcohol Use Disorders Identification Test' (AUDIT). The pattern consumption of harmful use and alcohol dependence evaluated with this test was the exclusion criteria for the control group. All the interviews were performed by experienced psychologists who had received PRISM training.

Plasma samples for analysis

Blood extractions were conducted prior to interviews in 12-hour fasted conditions and in the morning (9:00–11:00 AM). Venous blood samples were extracted into 10-ml K2 EDTA tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and to obtain plasma, samples were centrifuged at 2200 *g* for 15 minutes (4°C). Plasma was individually assayed by three rapid tests for detecting infectious diseases: HIV (Retroscreen HIV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd, Goa, India), hepatitis B (HBsAg Test, Toyo Diagnostics-Turkclab Inc., Izmir, Turkey) and hepatitis C (Flaviscreen HCV, QualPro Diagnostics-Tulip Group Ltd).

Each plasma sample was registered and characterized, dismissing those samples displaying infection following safety protocols. All samples were stored at -80°C until acyl derivative determination.

Quantification of acylethanolamides

The analysis of acylethanolamides in plasma was performed by a validated method previously described (Pastor *et al.* 2014). The following acylethanolamides were quantified: palmitoylethanolamide (PEA), stearoylethanolamide (SEA), OEA, POEA, AEA, LEA, DHEA, DGLEA and DEA. Briefly, aliquots of 0.5 ml of human plasma were transferred to 12-ml glass tubes, spiked with deuterated internal standards, diluted with 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.0) and extracted with *tert*-butyl methyl ether. The dry organic extracts were reconstituted in 100 μl of a mixture water:acetonitrile (10:90, v/v) with 0.1 percent formic acid (v/v) and transferred to HPLC vials. Twenty microliters was injected into the LC/MS-MS system. An Agilent 6410 triple quadrupole (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with a 1200 series binary pump, a column oven and a cooled auto-sampler (4°C) was used. Chromatographic separation was carried out with a ACQUITY UPLC C18-CSH column (3.1 \times 100 mm, 1.8- μm particle size) (Waters, Yvelines Cedex, France) maintained at 40°C with a mobile phase flow rate of 0.4 ml/minute. The composition of the mobile phase was: A: 0.1 percent (v/v) formic acid in water; B: 0.1 percent (v/v) formic acid in acetonitrile. Quantification was performed by isotope dilution. Deuterated internal standards were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), and solvents were from Merck (Darmstadt, Germany).

Ethics statement

Written informed consent was obtained from each subject after they had received a complete description of the study and been given the chance to discuss any questions or issues. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of Hospital

Regional Universitario de Málaga and therefore were conducted in accordance with the 'Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects' adopted in the Declaration of Helsinki by the World Medical Association.

Statistical analyses

Data are expressed as number and percentage of subjects [n (percent)] or means and standard deviation (SD) of concentrations [mean (SD)]. The significance of differences in categorical variables was determined by Fisher's exact test, while continuous variables were evaluated by different statistical approaches according to the number of comparisons and parametric assumptions. For comparisons of two groups, the Student's *t*-test and the Mann–Whitney *U* test were used as parametric and non-parametric test, respectively. Multiple analyses of covariance (ANCOVA) and linear regression models were performed using the log (10)-transformation for acylethanolamide concentrations as dependent variables to ensure assumptions about variances and slopes. Estimated marginal means [95% confidence intervals (95% CI)] of acylethanolamide concentrations were expressed after back-transformation. Multiple comparisons in ANCOVA were performed using Sidak's correction test.

Binary logistic regression models (backward stepwise approach) were used to identify the subset of acylethanolamides that best distinguished between abstinent alcohol-dependent and control subjects. All models satisfied the Hosmer–Lemeshow tests and the assumption of the linearity of the logit. The receiver operating characteristics (ROC) analysis evaluated the discriminative power of the logistic models through the area under the curve (AUC), including estimation of sensitivity and specificity.

Also, correlation analyses were performed through the Spearman's rank correlation coefficient (*rho*).

Overall, statistic values and degrees of freedom were indicated in the results when appropriate. Thus, a *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using Graph-Pad Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and IBM SPSS Statistical version 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTS

Sample demographics

After discarding patients exhibiting multiple drug consumption, a total of 158 subjects of both sexes were selected for this study and grouped into alcohol (*n* = 79) and control (*n* = 79) groups. A description of the sample is presented in Table 1. The average alcohol-dependent participant was a 49-year-old man with a BMI of 26. Control individuals were matched for age, gender and

BMI, and showed no significant differences compared with alcohol-dependent subjects.

Alcohol-dependent patients had significantly lower education level ($p < 0.05$) than controls. One-hundred percent of abstinent alcoholic patients requested psychological or psychiatric consultation while only 13 percent of control subjects were treated ($p < 0.001$). Regarding lifetime medication treatment for mental illness, 75 percent of alcohol-dependent patients received medication while 22 percent of controls were treated ($p < 0.001$). However, the prevalence of current pharmaceutical treatment in alcohol-dependent patients was as follows: 63 percent of patients received psychiatric medication, 67 percent of patients received disulfiram and 78 percent of patients received psychiatric medication and/or disulfiram.

All alcohol-dependent patients who participated in this study were diagnosed with only AUD and with no other substance use disorders. Concretely, the prevalence of abuse and dependence based on DSM-IV-TR was as follows: 9 percent of patients had only criteria for alcohol dependence and 91 percent of patients were diagnosed with abuse and dependence. In addition to substance use disorders, other psychiatric disorders were assessed in the sample. The control group included cases of mood disorders (3 percent), but abstinent alcoholic subjects showed significantly higher percentages of mood [39 percent ($p < 0.001$)], anxiety [13 percent ($p < 0.001$)], psychotic [9 percent ($p < 0.05$)] and personality [11 percent ($p < 0.01$)].

Plasma concentrations of acylethanolamides

We analyzed the plasma concentrations of acylethanolamides using a two-way ANCOVA with *group* (alcohol-dependent patients and controls) and *sex* (women and men) as factors and controlling for *age* and *BMI*. Data were examined to ensure statistical assumptions were met and a logarithmic transformation (base-10 logarithm) of acylethanolamide concentrations was performed prior to report the estimated marginal means. The back-transformed mean acylethanolamide concentrations (with 95% CI) are represented in Fig. 1.

All acylethanolamides were significantly affected by *group* factor (alcohol-dependent and control group): [PEA ($F_{1,152} = 32.90$, $p < 0.001$); SEA ($F_{1,152} = 12.56$, $p = 0.001$); POEA ($F_{1,152} = 47.51$, $p < 0.001$); OEA ($F_{1,152} = 50.29$, $p < 0.001$); LEA ($F_{1,152} = 47.04$, $p < 0.001$); DGLEA ($F_{1,152} = 48.20$, $p < 0.001$); AEA ($F_{1,152} = 29.62$, $p < 0.001$); DEA ($F_{1,152} = 72.28$, $p < 0.001$) and DHEA ($F_{1,152} = 20.17$, $p < 0.001$)]. Thus, abstinent alcohol-dependent patients had higher plasma concentrations of acylethanolamides than control subjects. In addition to *group* factor, we observed a significant main effect of *sex* factor on POEA concentration ($F_{1,152} = 13.53$, $p < 0.001$) with higher concentrations

Table 1 Baseline socio-demographic variables in abstinent alcohol-dependent and control subjects.

Variable		Control group (n = 79)	Alcohol group (n = 79)	p Value
Age [mean (SD)]		47.50 (7.9)	49.13 (9.6)	0.603 ^a
Sex[n(%)]	Women	28 (35.4)	27 (34.2)	1.000 ^b
	Men	51 (64.6)	52 (65.8)	
Body mass [mean (SD)]	Body Mass Index	24.62 (3.0)	25.83 (4.0)	0.351 ^a
Current marital status [n(%)]	Never married	31 (39.2)	20 (25.3)	0.112 ^b
	Married/cohabiting	37 (46.8)	38 (48.1)	
	Divorced/separated	11 (13.9)	20 (25.3)	
	Widowed	—	1 (1.3)	
Education level [n(%)]	≤ Primary/elementary	15 (19.0)	28 (35.4)	0.031 ^b
	≥ Secondary	64 (81.0)	51 (64.6)	
Work status [n(%)]	Employed	59 (74.7)	49 (62.0)	0.123 ^b
	Unemployed	20 (25.3)	30 (38.0)	
Psychological or psychiatric consultation [n(%)]	No	69 (87.3)	—	<0.001 ^b
	Yes	10 (12.7)	79 (100)	
Lifetime psychiatric medication [n(%)]	No	62 (78.5)	20 (25.3)	<0.001 ^b
	Yes	17 (21.5)	59 (74.7)	
Lifetime alcohol use disorders [n(%)]	Only abuse	—	—	—
	Only dependence	—	7 (8.9)	
	Abuse and dependence	—	72 (91.1)	
	Mood disorders	2 (2.5)	31 (39.2)	
Lifetime other psychiatric disorders [n(%)]	Anxiety disorders	—	10 (12.7)	<0.001 ^b
	Psychosis disorders	—	7 (8.9)	
	Personality disorders	—	9 (11.4)	

^ap Value from Student's *t*-test. ^bp Value from Fisher's exact test.

in women relative to men [women: 0.114 (95% CI = 0.094–0.138); and men: 0.073 (95% CI = 0.064–0.084)]. There was no interaction between factors for any acylethanolamide.

Regarding covariates, only *age* was significantly related to POEA ($F_{1,152} = 4.21$, $p = 0.042$), LEA ($F_{1,152} = 4.52$, $p = 0.035$) and DEA ($F_{1,152} = 5.47$, $p = 0.021$) concentrations.

Plasma concentrations of OEA, AEA and DEA distinguish alcohol-dependent subjects in abstinence

Because all acylethanolamide concentrations were significantly affected by *group* factor, a logistic regression model was generated to evaluate the potential of acylethanolamides as explanatory variables to discriminate abstinent alcohol-dependent patients and controls. We included *age* and *sex* as variables in the initial model at step 1.

As shown in Table 2, backward stepwise approach was used to generate the final model, which was restricted to four explanatory variables in the equation: three acylethanolamides (OEA, AEA and DEA) and *age*. The final model showed a good calibration ($X^2_s = 10.90$; $p = 0.208$) and the explained variation in the dependent variable (*group*) was 63 percent according to the

Nagelkerke R^2 method. For a better interpretation of the odds ratios, we transformed AEA and DEA (multiplying by 100) because this metric change does not affect the Wald values and corresponding *p* values.

The ROC curve analysis for this model showed an AUC = 0.916 ($p < 0.001$) (Fig. 2A), which indicates a high discriminative power. A representative cut-off value was 0.54 [sensitivity: 0.86 (95% CI = 0.77–0.93); specificity: 0.85 (95% CI = 0.75–0.92)]. Regarding the scatter plot of the predictive probabilities for alcohol-dependent and control subjects, the means were significantly different between both groups ($U = 589$, $p < 0.001$) (Fig. 2B).

From multiple logistic models, we generated ROC curves for OEA, AEA and DEA separately to assess the accuracy of these molecules as possible predictors of alcohol-dependent patients in abstinence (Fig. 2C). Thus, the ROC curve for OEA showed an AUC = 0.799 ($p < 0.001$) and a representative cut-off value of 0.53 (sensitivity: 0.71; specificity: 0.71). The ROC curve for AEA indicated an AUC = 0.740 ($p < 0.001$) and a representative cut-off value of 0.54 (sensitivity: 0.65; specificity: 0.65). The ROC curve for DEA showed an AUC = 0.830 ($p < 0.001$) and a representative cut-off value of 0.54 (sensitivity: 0.77; specificity: 0.76). The means (SD) of predictive probabilities for abstinent alcoholic and control

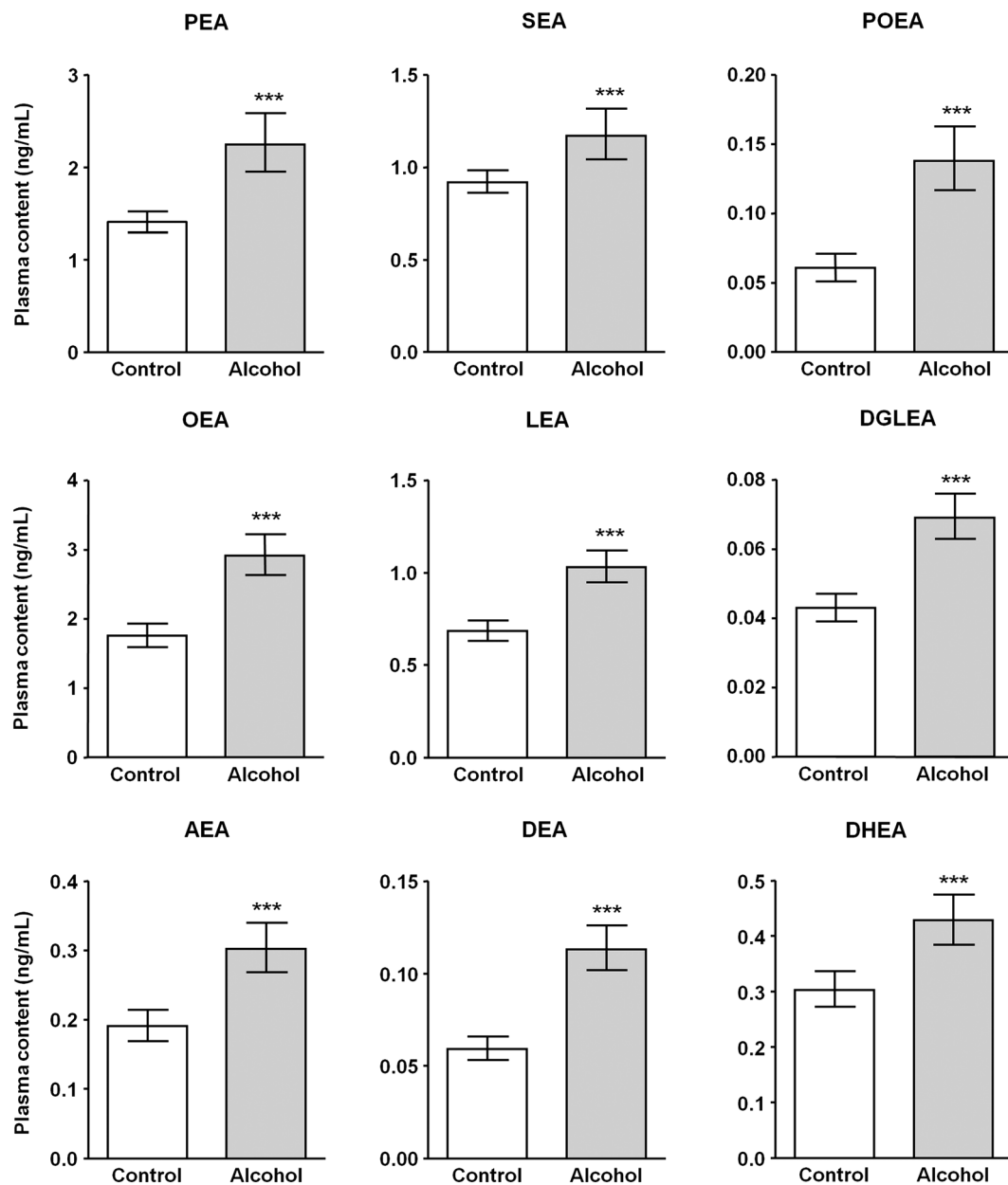


Figure 1 Plasma concentrations of acylethanolamides in abstinent alcohol-dependent and control subjects. Bars are back-transformed means and 95% CI from logarithmic data. (***) indicates $p < 0.001$ compared with the control group

Table 2 Stepwise logistic regression model based on plasma acylethanolamide concentrations for abstinent alcohol-dependent and control subjects.

Variable	B	SE	W	df	p Value	e ^B (Odds ratio)	95% CI for e ^B	
							Lower	Upper
OEA	-2.180	0.541	16.240	1	<0.001	0.113	0.039	0.326
AEA ^a	0.259	0.061	18.088	1	<0.001	1.295	1.150	1.459
DEA ^a	-0.765	0.152	25.353	1	<0.001	0.466	0.346	0.627
Age	-0.086	0.027	9.792	1	0.002	0.918	0.870	0.968
Constant	9.300	1.845	25.406	1	<0.001	10 933.221	—	—

Abbreviations: B = coefficient; SE = standard error; W = Wald test; df = degrees of freedom; e^B = Euler constant; CI = confidence interval. Variables entered at step 1: PEA, SEA, POEA, OEA, LEA, DGLEA, AEA, DEA, DHEA, sex and age. Hosmer and Lemeshow test: ($X^2_8 = 10.897$; $p = 0.208$). Nagelkerke $R^2 = 0.629$. ^a()AEA and DEA were transformed multiplying by 100.

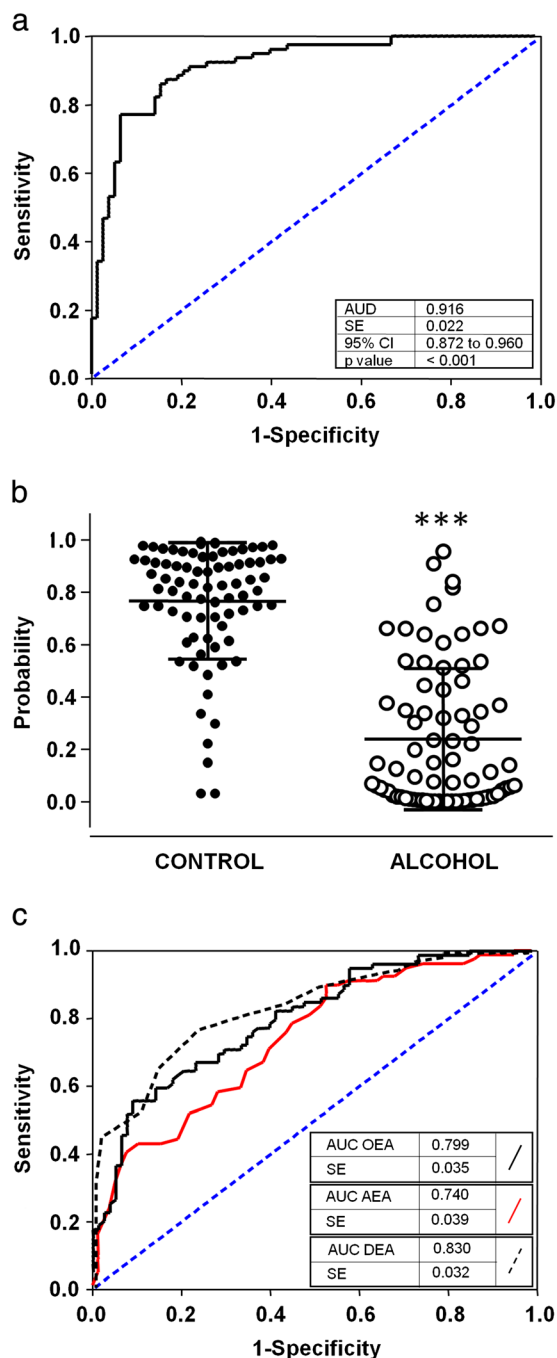


Figure 2 ROC analyses and scatter dots for predictive logistic models of alcohol-dependent patients in abstinence. ROC curve for the final multivariable model using four predictors: age and plasma concentrations of OEA, AEA and DEA (**A**); and scatter plot of the predictive probabilities from this model (**B**). ROC curves for the simple models with OEA, AEA and DEA (**C**). Lines on the scatter plot are means and SD

subjects were as follow: OEA, 0.368 (0.243) and 0.637 (0.204); AEA, 0.416 (0.211) and 0.589 (0.167); and DEA, 0.343 (0.246) and 0.662 (0.223), respectively. For all the cases, the means between groups resulted in significant differences [$U=1242$ (OEA), $U=1603$ (AEA), $U=1044$ (DEA); $p<0.001$].

Plasma concentrations of acylethanolamides in relation to variables related to alcohol use disorder

In the alcohol group, multivariable linear regression models for each acylethanolamide were performed to test the effect of variables related to alcohol use disorder. We included *duration of alcohol abstinence*, *duration of problematic alcohol use* and *DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence* as independent variables of interest, but also *sex* and *age* as additional independent variables. Because data were examined to ensure statistical assumptions were met, logarithmic transformations (base-10 logarithm) of acylethanolamide concentrations and duration of alcohol abstinence were performed.

However, the regression models revealed only a significant effect of *duration of alcohol abstinence* on OEA ($t_{73} = -2.060$, $p = 0.042$), AEA ($t_{73} = -2.990$, $p = 0.004$) and DEA ($t_{73} = -3.121$, $p = 0.003$). Therefore, the same acylethanolamides chosen to distinguish between abstinent alcoholic patients were significantly affected by *duration of abstinence*. In fact, correlation analyses between these acylethanolamide concentrations and abstinence showed a statistically significant negative correlation: OEA, $\rho = -0.313$ ($p = 0.005$) Fig. 3A; AEA, $\rho = -0.396$ ($p < 0.001$) Fig. 3B; and DEA, $\rho = -0.436$ ($p < 0.001$) Fig. 3C.

Plasma concentrations of OEA, AEA and DEA in relation to duration of alcohol abstinence

We examined the effect of alcohol abstinence on plasma concentrations of OEA, AEA and DEA through categorizing the duration of alcohol abstinence in three balanced subgroups. A two-way ANCOVA was performed with *alcohol abstinence* (<4, 4–8 and >8 months) and *sex* (women and men) as factors and controlling for *age*. A logarithmic transformation (base-10 logarithm) of acylethanolamide concentrations was performed prior to report the effects. The estimated marginal means of logarithmic values were back-transformed to OEA (Fig. 3D), AEA (Fig. 3E) and DEA (Fig. 3F) concentrations with 95% CI in order to represent each subgroup of *alcohol abstinence*.

As expected, there was a significant main effect of *alcohol abstinence* on OEA ($F_{2,72} = 4.33$, $p = 0.017$), and the multiple comparisons showed a significant decrease in the subgroup with alcohol abstinence >8 months compared with the subgroup <4 months ($p < 0.05$) (Fig. 3D). Also, there was a main effect of *abstinence* on AEA concentration ($F_{2,72} = 5.61$, $p = 0.006$), and the *post-hoc* comparisons indicated a significant decrease in the subgroups with longer duration of abstinence (4–8 months: $p < 0.05$; >8 months: $p < 0.01$) compared with the subgroup <4 months (Fig. 3E). Similar to AEA, DEA concentration was affected by *alcohol abstinence* ($F_{2,72} = 7.33$,

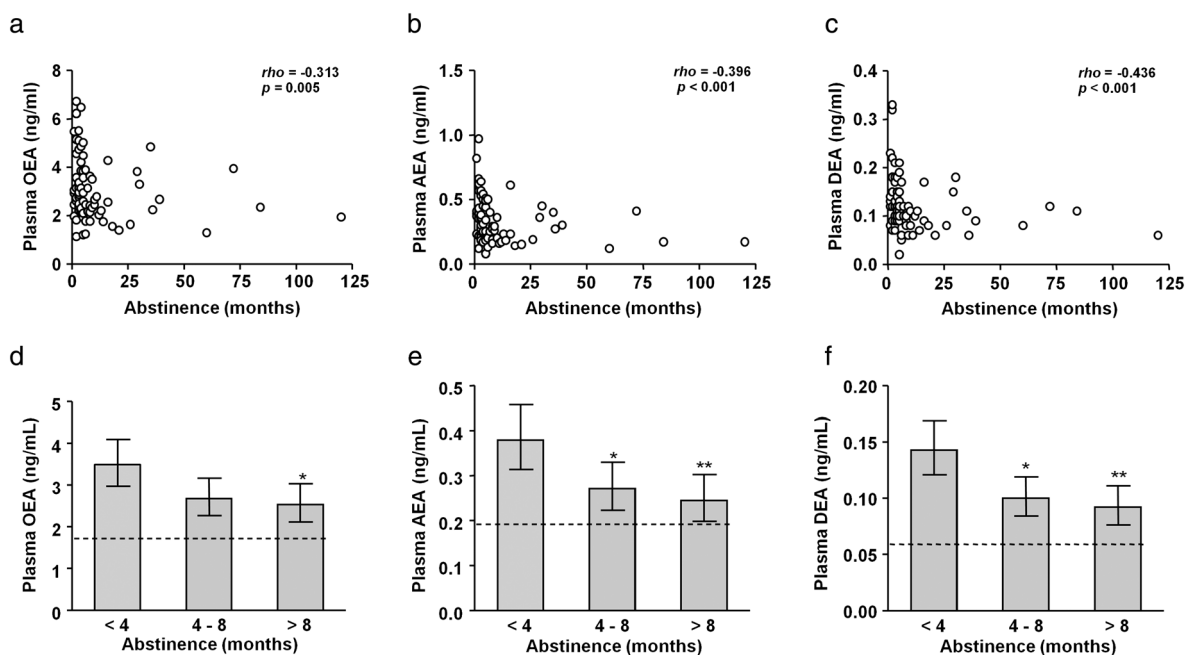


Figure 3 Plasma concentrations of OEA, AEA and DEA in relation to the duration of alcohol abstinence. Correlation analysis between the duration of alcohol abstinence (months) and plasma concentrations of OEA (**A**), AEA (**B**) and DEA (**C**). Spearman's correlation coefficients (ρ) are indicated. Plasma concentration of OEA (**D**), AEA (**E**) and DEA (**F**) in alcohol-dependent patients divided into three subgroups according to the duration of alcohol abstinence. Bars are back-transformed means and 95% CI from logarithmic data. (*) indicates $p < 0.05$ and (**) indicates $p < 0.01$ compared with the <4 subgroups. Dot-lines represent the mean concentrations in the control group

$p = 0.001$), and the multiple comparisons showed a significant decrease in the subgroups with longer duration of abstinence (4–8 months: $p < 0.05$; >8 months: $p < 0.01$) relative to the subgroup <4 months (Fig. 3F).

Plasma concentrations of acylethanolamide in relation to comorbid psychiatric disorders

Alcohol-dependent patients in abstinence displayed high prevalence of Axis I and II psychiatric disorders ($n = 44$, 55.7 percent) at some time in their lives. Because acylethanolamides have been linked to psychiatric disorders, we studied the effect of psychiatric comorbidity on plasma concentrations of acylethanolamides using a two-way ANCOVA with *psychiatric comorbidity* (diagnosed or not) and *sex* (women and men) as factors and controlling for *age* and *BMI*. Once again, acylethanolamide concentrations were logarithmically transformed prior to analysis.

There was no main effect of *psychiatric comorbidity* on plasma concentrations of acylethanolamides. Regarding *sex* factor, only POEA concentration was significantly affected by *sex* ($F_{1,74} = 4.29$, $p = 0.042$) with higher POEA concentration in women relative to men [women: 0.170 (95% CI=0.124–0.233) and men: 0.116 (95% CI=0.095–0.141)]. Finally, there were no interactions between both factors and covariates were not related to acylethanolamide concentrations.

Finally, alcohol-dependent patients in abstinence displayed high prevalence of pharmaceutical treatment for mental illness at current time. Specifically, the patients received treatment with antidepressants (35 percent), anxiolytics (29 percent), antipsychotics (3 percent) or antiepileptics (24 percent). We performed additional comparisons of the acylethanolamide concentrations considering the different groups of treatment (data not shown). However, we did not observe any difference between different groups, discarding any influence of the medication on the present findings.

DISCUSSION

In agreement with recent evidence in animal models, the present study demonstrates that OEA is a bioactive lipid mediator linked to alcohol consumption in humans. We found that plasma concentration of OEA and other acylethanolamides were increased in alcohol-dependent patients in abstinence. Moreover, OEA, AEA and DEA concentrations were negatively correlated to the duration of alcohol abstinence. However, we observed no effects of other variables associated with alcohol use disorder on acylethanolamide concentrations including criteria for alcohol abuse and dependence, duration of problematic alcohol use or psychiatric comorbidity. Collectively, these findings suggest that acylethanolamides are altered during alcohol abstinence, and particularly OEA, AEA and

DEA might act as potential indicators for the duration of alcohol abstinence.

It has been described that acute exposure to high doses of ethanol decreases acylethanolamide concentrations in different brain regions and peripheral tissues in rodents (Ferrer *et al.* 2007; Rubio *et al.* 2007). In agreement with that, acute consumption of moderate amount of alcohol also reduces circulating AEA concentrations in humans (Feuerecker *et al.* 2012). However, when considering chronic exposure to ethanol, numerous preclinical studies have addressed the increase in AEA concentrations caused by long periods of alcohol exposure (Basavarajappa & Hungund 1999; Gonzalez *et al.* 2002; Basavarajappa *et al.* 2003; Gonzalez *et al.* 2004). In the case of OEA, both acute and chronic exposure to ethanol raises circulating concentrations of this acylethanolamide. These studies are in good accordance with the present findings. We found that circulating concentrations of OEA and other acylethanolamides were increased in patients with a long history of alcohol addiction. Because it has been reported that plasma concentrations of acylethanolamides are altered in humans diagnosed with cocaine addiction (Pavon *et al.* 2013), we selected subjects diagnosed with alcohol use disorder that were not diagnosed with other substance use disorders. The fact that all acylethanolamides were similarly affected by alcohol use suggests that the origin of these alterations might be dependent on changes in the biosynthesis or degradation pathways of acylethanolamides. Although numerous reports suggest that genetic alterations in FAAH expression or function confer susceptibility to alcohol addiction [for review, see (Serrano & Parsons 2011)], it has not been observed changes in FAAH activity associated with acylethanolamide alterations after ethanol exposure (Ferrer *et al.* 2007; Rubio *et al.* 2009). Thus, the increase of acylethanolamide concentrations observed in the present study might be through an overactivation of the *N*-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD), which is involved in the biosynthesis of acylethanolamides (Hansen *et al.* 1997; Giuffrida *et al.* 1999; Stella & Piomelli 2001). There is compelling evidence that alcohol is able to modulate several classical neurotransmitters that activate specific receptors coupled to NAPE-PLD pathway (Stella & Piomelli 2001; Ferrer *et al.* 2007; Spanagel 2009). In fact, glutamate plays a main role in alcohol use disorder (Tsai, Gastfriend, & Coyle 1995; Tsai & Coyle 1998) and it has been reported that chronic ethanol exposure induces an increase of glutamate release, which activates the NAPE-PLD-dependent release of acylethanolamides by engaging NMDA receptors (Dahchour & De Witte 2000; Ferrer *et al.* 2007). Although this modulation of glutamate release might contribute to the enhancement of

acylethanolamide formation, the changes observed in the plasma of alcohol users might be also associated with the sympathetic activation by alcohol exposure (Spanagel 2009). In this regard, previous studies have described an increase of OEA mobilization in peripheral tissues after an activation of the sympathetic nervous system (Guzman *et al.* 2004; LoVerme *et al.* 2006; Fu *et al.* 2011).

We demonstrated a significant relationship between plasma OEA concentrations and the duration of abstinence. When we compared subgroups of alcohol-dependent patients with different lengths of alcohol abstinence, we found that OEA concentration was increased during early abstinence relative to control subjects. However, the OEA concentration was gradually decreasing as advanced the duration of abstinence, approaching the control group. In agreement with these findings, studies in rats have reported a constant elevation of plasma OEA during chronic ethanol consumption that starts to decrease after removing alcohol (Ferrer *et al.* 2007; Bilbao *et al.* 2015). While the concentrations of other acylethanolamides were also altered in abstinent alcohol users, only AEA and DEA displayed a similar profile to OEA relative to the duration of alcohol abstinence. Nevertheless, these unsaturated acylethanolamides were the best explanatory variables to distinguish abstinent alcoholic subjects from controls.

We did not observe changes in circulating acylethanolamides associated with the alcohol addiction severity using DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence. This finding is similar to the results reported by our group in the plasma of abstinent cocaine users (Pavon *et al.* 2013). In spite of the high prevalence of lifetime psychiatric comorbidity in our sample, we did not find any influence of dual diagnosis on acylethanolamide concentrations. There are some clinical studies reporting high circulating concentrations of acylethanolamides associated with mental disorders (De Marchi *et al.* 2003; Hill *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2011) as well as with dual diagnosis. For example, Potvin and colleagues have found elevated concentrations of OEA and AEA in the plasma of patients with schizophrenia and comorbid substance use disorders (Potvin *et al.* 2008). Similarly, OEA and also POEA concentrations are increased in subjects with cocaine use disorders and comorbid mood disorders (Pavon *et al.* 2013). The lack of effects by the diagnosis of psychiatric comorbidity in the present study might be because of our patients displayed only alcohol use disorders but no other substance use disorders (e.g. cannabis or cocaine).

Because it has been described that OEA and AEA concentrations are increased in the plasma of cirrhotic patients (Caraceni *et al.* 2010) and the prevalence of alcohol-induced liver disease was nearly 31 percent in our sample, we compared the acylethanolamide

concentrations between alcohol-dependent patients with and without alcoholic liver disease (data not shown). However, we did not observe any difference between both subgroups, discarding any influence of the liver damage on the present findings.

Finally, we found sex differences on POEA concentration, with higher concentration in women than in men. Similarly, it has been also reported that plasma concentration of POEA is altered in women diagnosed with cocaine use disorders but the meaning of this sexual dimorphism is unknown and further research is needed.

We are aware that the present study has some limitations that future research should address. First, the study was conducted on outpatient subjects and consequently social and environmental factors have to be taken into consideration. Second, because a high percentage of alcohol-dependent patients were under different pharmacological treatment, we cannot exclude the influence of specific medications on the circulating concentrations of acylethanolamides, although our statistical analysis did not reveal any significant effect. Third, a longitudinal study during alcohol abstinence could indicate whether the change of acylethanolamide concentrations is time-dependent. Finally, this study was conducted in alcohol dependence but we have to investigate the impact of other patterns of alcohol consumption in the plasma concentrations of acylethanolamides such as chronic intoxication, binge drinking or alcohol abuse.

In conclusion, the present findings support that OEA as well as other unsaturated acylethanolamides such as AEA and DEA are associated with a history of alcohol consumption and abstinence. Their monitoring in alcohol dependence may be useful for therapeutic purposes.

Acknowledgments

The present study has been supported by the following grants: Ministerio de Economía y Competitividad and Instituto de Salud Carlos III (PI13/02261); Instituto de Salud Carlos III and EU-ERDF (Subprograma RETICS Red de Trastornos Adictivos RD12/0028/0001); Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad and Plan Nacional sobre Drogas (049/2013); Junta de Andalucía, Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI CTS-433); Junta de Andalucía-Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (PI45403); Junta de Andalucía-Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales (PI-0823-2012 and PI-0228-2013). FJP, JS and AS hold a 'Miguel Servet' research contract from Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER/EU-ERDF) (CP14/00212, CP12/03109 and CP14/00173, respectively), PR-S holds a 'Rio Hortega' research contract from

ISC-III (CM13/00115) and EC-O holds a 'Sara Borrell' research contract from ISC-III (CD12/00455).

Conflict of Interest

The authors state no competing financial interests or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

Author Contributions

FRF and AS were responsible for the study concept and design. NG-M and GR recruited participants. NG-M, PA, MP and PR-S contributed to the acquisition of psychiatric data by means of interviews. MC and FJP extracted and processed blood samples. AP, AB and RT performed the quantification of acyl derivatives from plasma. FJP, JS, EC-O and LO assisted with data analysis and interpretation of findings. AS, FJP and FRF drafted the manuscript. RT and MT provided critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

References

- Ahern GP (2003) Activation of TRPV1 by the satiety factor oleylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429–30434.
- Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, Garcia-Marchena N, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Romero P, Suarez J, Baixeras E, de la Torre R, Montesinos J, Guerri C, Rodriguez-Arias M, Minarro J, Martinez-Riera R, Torrens M, Chowen JA, Argente J, Mason BJ, Pavon FJ, Rodriguez de Fonseca F (2015) Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* 20:756–72.
- Basavarajappa BS, Hungund BL (1999) Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. *J Neurochem* 72:522–528.
- Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL (2003) Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol* 466:73–83.
- Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Spanagel R, Rodriguez de Fonseca F (2013) Oleylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* 18:78–87.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavon FJ, Giuffrida A, Suarez J, Garcia-Marchena N, Baixeras E, Gomez de Heras R, Orio L, Alen E, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodriguez de Fonseca F (2015) Role of the satiety factor oleylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol* in press (doi: 10.1111/adb.12276).
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 152:567–575.

- Caraceni P, Viola A, Piscitelli F, Giannone F, Berzigotti A, Cescon M, Domenicali M, Petrosino S, Giampalma E, Riili A, Grazi G, Golfieri R, Zoli M, Bernardi M, Di Marzo V (2010) Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver Int* 30:816–825.
- Dahchour A, De Witte P (2000) Taurine blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate of ethanol-dependent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 65:345–350.
- De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V (2003) Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis* 2:5.
- Desfosses J, Stip E, Bentaleb LA, Lipp O, Chiasson JP, Furtos A, Venne K, Kouassi E, Potvin S (2012) Plasma endocannabinoid alterations in individuals with substance use disorder are dependent on the “mirror effect” of schizophrenia. *Front Psychiatry* 3:85.
- Di Marzo V (1998) ‘Endocannabinoids’ and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1392:153–175.
- Di Marzo V (2011) Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14:9–15.
- Ferrer B, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Alvarez-Jaimes L, Sanchez-Vera I, Giuffrida A, Serrano A, Baixeras E, Khaturia S, Navarro M, Parsons LH, Piomelli D, Rodriguez de Fonseca F (2007) Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J* 404:97–104.
- Feuerecker M, Hauer D, Gresset T, Lassus S, Kaufmann I, Vogeser M, Briegel J, Hornuss C, Chouker A, Schelling G (2012) Effect of an acute consumption of a moderate amount of ethanol on plasma endocannabinoid levels in humans. *Alcohol Alcohol* 47:226–232.
- Fu J, Dipatrizio NV, Guijarro A, Schwartz GJ, Li X, Gaetani S, Astarita G, Piomelli D (2011) Sympathetic activity controls fat-induced oleoylethanolamide signaling in small intestine. *J Neurosci* 31:5730–5736.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* 425:90–93.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2:358–363.
- Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954:73–81.
- Gonzalez S, Valenti M, de Miguel R, Fezza F, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V, Ramos JA (2004) Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. *Br J Pharmacol* 143:455–464.
- Grosshans M, Schwarz E, Bumb JM, Schaefer C, Rohleder C, Vollmert C, Vollstadt-Klein S, Tost H, Meyer-Lindenberg A, Kiefer F, Leweke FM (2014) Oleoylethanolamide and human neural responses to food stimuli in obesity. *JAMA Psychiatry* 71:1254–1261.
- Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α). *J Biol Chem* 279:27849–27854.
- Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Vinggaard AM, Frandsen A, Schousboe A (1997) Characterization of glutamate-induced formation of N-acylphosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine in cultured neocortical neurons. *J Neurochem* 69:753–761.
- Hasin DS (2012) Introduction to DSM-5 criteria linked papers in drug and alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 122:20–21.
- Hasin DS, O’Brien CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, Budney A, Compton WM, Crowley T, Ling W, Petry NM, Schuckit M, Grant BF (2013) DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *Am J Psychiatry* 170:834–851.
- Hasin DS, Trautman KD, Miele GM, Samet S, Smith M, Endicott J (1996) Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry* 153:1195–1201.
- Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2008) Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* 41:48–53.
- LoVerme J, Guzman M, Gaetani S, Piomelli D (2006) Cold exposure stimulates synthesis of the bioactive lipid oleoylethanolamide in rat adipose tissue. *J Biol Chem* 281:22815–22818.
- Mangieri RA, Hong KI, Piomelli D, Sinha R (2009) An endocannabinoid signal associated with desire for alcohol is suppressed in recently abstinent alcoholics. *Psychopharmacology (Berl)* 205:63–72.
- Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, Scherma M, Fratta W, Fadda P, Barnes C, Redhi GH, Yasar S, Le Foll B, Tanda G, Piomelli D, Goldberg SR (2011) Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of α -type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry* 69:633–641.
- Orio L, Pavon FJ, Blanco E, Serrano A, Araos P, Pedraz M, Rivera P, Calado M, Suarez J, de Fonseca FR (2013) Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr Pharm Des* 19:7036–7049.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 3:167–175.
- Pastor A, Farre M, Fito M, Fernandez-Aranda F, de la Torre R (2014) Analysis of ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J Lipid Res* 55:966–977.
- Pavon FJ, Araos P, Pastor A, Calado M, Pedraz M, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Serrano A, Blanco E, Rivera P, Suarez J, Romero-Cuevas M, Pujadas M, Vergara-Moragues E, Gornemann I, Torrens M, de la Torre R, Rodriguez de Fonseca F (2013) Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* 18:955–969.
- Pavón FS, Serrano A, Romero-Cuevas M, Alonso M, Rodríguez de Fonseca F (2010) Oleoylethanolamide: a new player in the peripheral control of energy metabolism. Therapeutic implications. *Drug Discov Today Dis Mech* 7:e175–e183.
- Potvin S, Kouassi E, Lipp O, Bouchard RH, Roy MA, Demers MF, Gendron A, Astarita G, Piomelli D, Stip E (2008) Endogenous cannabinoids in patients with schizophrenia and substance use disorder during quetiapine therapy. *J Psychopharmacol* 22:262–269.
- Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TE, Burke J, Farmer A, Jablenski A, Pickens R, Regier DA, Sartorius N, Towle LH (1988) The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in

- conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry* 45:1069–1077.
- Rubio M, de Miguel R, Fernandez-Ruiz J, Gutierrez-Lopez D, Carai MA, Ramos JA (2009) Effects of a short-term exposure to alcohol in rats on FAAH enzyme and CB1 receptor in different brain areas. *Drug Alcohol Depend* 99:354–358.
- Rubio M, McHugh D, Fernandez-Ruiz J, Bradshaw H, Walker JM (2007) Short-term exposure to alcohol in rats affects brain levels of anandamide, other N-acyl ethanolamines and 2-arachidonoyl-glycerol. *Neurosci Lett* 421:270–274.
- Schwarz E, Whitfield P, Nahnsen S, Wang L, Major H, Leweke FM, Koethe D, Lio P, Bahn S (2011) Alterations of primary fatty acid amides in serum of patients with severe mental illness. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:308–314.
- Serrano A, Parsons LH (2011) Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther* 132:215–241.
- Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E, Cravatt BF (2002) A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8394–8399.
- Spanagel R (2009) Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649–705.
- Stella N, Piomelli D (2001) Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425:189–196.
- Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licona-Limon P, Ren X, Lam TT, Schwartz GJ, de Araujo IE (2013) A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science* 341:800–802.
- Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R (2004) Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry* 161:1231–1237.
- Tsai G, Coyle JT (1998) The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 49:173–184.
- Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT (1995) The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psychiatry* 152:332–340.
- WHO (2014) Global status report on alcohol and health.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457.

Estudio III

Plasma chemokines in patients with alcohol use disorders: Association of Eotaxin-1 (CCL11) with psychiatric comorbidity.

Nuria García-Marchena^{1#}; Pedro Araos^{1#}; Vicente Barrios^{2,3, #}; Laura Sánchez-Marín¹, Julie A. Chowen^{2,3}; María Pedraz¹; Estela Castilla-Ortega¹; Pablo Romero-Sanchiz¹Guillermo Ponce⁴; Ana L. Gavito¹; Juan Decara¹; Daniel Silva⁵; Marta Torrens^{6,7}; Jesús Argente^{2,3}; Gabriel Rubio^{4,5}; Antonia Serrano^{1*}; Francisco Javier Pavón^{1*}; Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,5*}.

¹ Unidad Gestión Clínica de Salud Mental. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, Spain; ² Department of Endocrinology. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Department of Pediatrics. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain; ³ CIBER Fisiopatología de la obesidad y nutrición (CIBERObn). Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain; ⁴ Servicio de Psiquiatría. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid, Spain; ⁵ Facultad de Psicología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain; ⁶ Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) and Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Barcelona, Spain; ⁷ Department of Psychiatry. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Barcelona, Spain.

En revisión en:



Plasma Chemokines in Patients with Alcohol Use Disorders: Association of CCL11 (Eotaxin-1) with Psychiatric Comorbidity

Nuria G. Marchena^{1, 2}, Pedro Fernando Araos¹, Vicente Barrios^{3, 4}, Laura Sanchez-Marin¹, Julie A. Chowen^{3, 4}, María P. Fernandez¹, Estela Castilla-Ortega¹, Pablo Romero-Sanchiz¹, Guillermo Ponce⁵, Ana Luisa Gavito¹, Juan Decara¹, Daniel Silva², Marta Torrens⁶, Jesús Argente^{3, 4}, Gabriel Rubio⁵, Antonia Serrano¹, FRANCISCO JAVIER PAVON¹, FERNANDO RODRIGUEZ DE FONSECA^{1, 2*}

¹UNIDAD DE GESTION CLINICA DE SALUD MENTAL, INSTITUTO IBIMA, Spain, ²Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Psicología, Spain, ³Department of Pediatrics and Pediatric Endocrinology,, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de Madrid, Spain, ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain, ⁵Servicio de Psiquiatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Spain, ⁶Servicio de Psiquiatría, IMIM-Hospital del Mar, Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Psychiatry

Specialty Section:
Psychopharmacology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
233260

Received on:
27 Sep 2016

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

FRF, FJP and AS designed the study and obtained the financial support. NGM, PA, MP, PR, GP and GR recruited and examined patients and controls, and generated the database. LSM, EC, DS and JD did the animal experiments and measured rat chemokines. VB, JAC and JA measured and analyzed human chemokines. AS, FJP and NGM analyzed the results and did statistical analysis. FJP and FRF wrote the manuscript that was revised by all authors.

Keywords

chemokine, Alcoholism, Psychiatric comorbidity, Outpatient setting, PRISM, CCL11, Eotaxin, Sex

Abstract

Word count: 288

Recent studies have linked changes in peripheral chemokine concentrations to the presence of both, addictive behaviors and psychiatric disorders. The present study further explore this link by analyzing the potential association of psychiatric comorbidity with alterations in the concentrations of circulating plasma chemokine in patients diagnosed of alcohol use disorder (AUD) of both sexes. To this end, eighty-five abstinent subjects with AUD from an outpatient setting and 55 healthy subjects were evaluated for substance and mental disorders. Plasma samples were obtained to quantify chemokine concentrations [C-C motif (CC), C-X-C motif (CXC) and C-X3-C (CX3C) motif chemokines]. Abstinent AUD patients displayed a high prevalence of comorbid mental disorders (72%) and other substance use disorders (45%). Plasma concentrations of chemokines CXCL12/SDF-1 ($p < 0.001$) and CX3CL1/fractalkine ($p < 0.05$) were lower in AUD patients compared to controls, whereas CCL11/eotaxin-1 concentrations were strongly decreased in female AUD patients ($p < 0.001$). Focusing on comorbid psychiatric disorders, we distinguish between patients with additional mental disorders ($N = 61$) and other substance use disorders ($N = 38$). Only CCL11 concentrations were found to be altered in AUD patients diagnosed with lifetime mental disorders ($p < 0.01$) with a permanent effect of sex and age throughout the study. Thus, patients with mood disorders ($N = 42$) and/or anxiety ($N = 16$) had lower CCL11 concentrations than non-comorbid patients. The alcohol-induced alterations in circulating chemokines were also explored in two preclinical models of alcohol use. Experiments conducted in male Wistar rats exposed to ethanol (3 g/kg, gavage) for 4 weeks resulted in a significant reduction in plasma CXCL12 concentrations and increases in CCL11 concentrations that were potentiated by the prior exposure to restraint stress. These results clearly indicate a contribution of specific chemokines to the phenotype of AUD, revealing a link of CCL11 to alcohol and anxiety/stress that deserves further investigation.

Funding statement

The present study has been supported by RETICS Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0021) funded by Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU); Research projects funded by Ministerio de Economía y Competitividad and ISC-III (PI13/02261 and PI16/01953); Research projects funded by Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad and Plan Nacional sobre Drogas (049/2009 and 049/2013); Research project funded by Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía and ERDF-EU (CTS-433); Research projects funded by Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía (PI0228-2013 and PI0823-2012). AS and FJP hold Miguel Servet research contracts funded by ISC-III and ERDF-EU (CP14/00173 and CP14/00212, respectively). PR-S holds a 'Río Hortega' research contract funded by ISC-III and ERDF-EU (CM13/0115). EC-O holds a 'Sara Borrell' research contract funded by ISC-III and ERDF-EU (CD12/00455).

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: Yes

Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with disabilities or endangered animal species

As per the Frontiers authors guidelines, you are required to use the following format for statements involving human subjects: This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee' with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the 'name of committee'.

For statements involving animal subjects, please use:

This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.

If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).

Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.

The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the CEI Provincial de Málaga and Hospital Universitario 12 de Octubre in accordance with the 'Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects' adopted in the Declaration of Helsinki by the World Medical Association (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013), Recommendation No.R (97) 5 of the Committee of Ministers to Member States on the Protection of Medical Data (1997) and Spanish data protection act (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, LOPD)

In review

TITLE

‘Plasma Chemokines in Patients with Alcohol Use Disorders: Association of CCL11 (Eotaxin-1) with Psychiatric Comorbidity’

RUNNING TITLE

Chemokines and alcohol

AUTHORS AND AFFILIATIONS

Nuria García-Marchena ^{1,5} &; Pedro Araos ¹, &; Vicente Barrios ^{2,3}, &; Laura Sánchez-Marín ¹; Julie A. Chowen ^{2,3}; María Pedraz ¹; Estela Castilla-Ortega ¹; Pablo Romero-Sanchiz ¹; Guillermo Ponce ⁴; Ana L. Gavito ¹; Juan Decara ¹; Daniel Silva⁵; Marta Torrens ^{6,7}; Jesús Argente ^{2,3}; Gabriel Rubio ⁴; Antonia Serrano ^{1*}; Francisco Javier Pavón ^{1*}; Fernando Rodríguez de Fonseca ^{1,5*}

¹ Unidad Gestión Clínica de Salud Mental. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, Spain; ² Department of Endocrinology. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Department of Pediatrics. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain; ³ CIBER Fisiopatología de la obesidad y nutrición (CIBERObn). Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain; ⁴ Servicio de Psiquiatría. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid, Spain; ⁵ Facultad de Psicología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain; ⁶ Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions (INAD) and Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Barcelona, Spain; ⁷ Department of Psychiatry. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Barcelona, Spain.

(*) These authors contributed equally to the present study.

1. INTRODUCTION

Substantial evidence suggests that the immune system modulates behaviors through specific actions of inflammatory signals acting in the central nervous system (CNS) (Salim et al., 2012). Among these signals, chemokines are chemoattractants involved in cellular migration and intercellular communication (Trecki and Unterwald, 2009) which are known to regulate neuronal development, survival, and regeneration in the CNS (Crews et al., 2011). Chemokines might reach the brain through the blood compartment, but also they can be released by neurons and glial cells in response to physiological or pathological conditions. In particular, the resident immune cells (microglia) have a prominent role in the mediation of chemokine actions. They have been reported to be involved in synaptic remodeling, an essential step in behavioral consolidation and acquisition. Moreover, chemokine receptors expressed by microglia contribute to brain development, especially during critical developmental periods, controlling essential processes such as synaptic pruning (Paolicelli et al., 2011; Stuart et al., 2014). Consequently, dysregulation in the chemokine signaling and neuroinflammation have been proposed to contribute to cognitive dysfunctions and mental diseases (Salim et al., 2012).

Additionally, alterations in circulating chemokines [e.g., chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2, also referred to monocyte chemoattractant protein-1/MCP-1), chemokine C-C motif ligand 11 (CCL11, eotaxin-1), chemokine C-X-C motif ligand 8 (CXCL8, interleukin-8/IL-8) and chemokine C-X-C motif ligand 12 (CXCL12, stromal cell-derived factor-1/SDF-1)] have been recently associated with psychiatric disorders such as cocaine use disorder (Pedraz et al., 2015), mood disorders (Magalhaes et al., 2014; Oglodek et al., 2014), generalized anxiety (Oglodek et al., 2015), personality disorders (Oglodek et al., 2015) and Alzheimer's disease (Westin et al., 2012). Collectively these findings suggest that these inflammatory signals could be considered as pathologically relevant biomarkers or therapeutic targets for psychopathologies (Stuart and Baune, 2014).

Concerning drug use disorders, a growing literature indicates that the pharmacodynamic actions of alcohol and other drugs of abuse involve the central activation of immune signaling (Coller and Hutchinson, 2012). Thus, studies in rodents have revealed that drug-induced alterations in chemokines, such as CXCL12 and CCL2, promote common addictive behaviors in a brain region-specific manner (Guyon et al., 2009; Trecki and Unterwald, 2009; Trocello et al., 2011; Kane et al., 2013). Additional studies in alcoholics have reported activated microglia and increased concentrations of CCL2 and other inflammatory molecules in multiple brain regions (He and Crews, 2008; Crews et al., 2011). These elevated CCL2 concentrations have also been detected in the cerebrospinal fluid of alcoholics, correlating with plasma concentrations of liver transaminases (Umhau et al., 2014). Chemokines and their receptors are known for their role in liver injury, especially the CC-chemokine family in animal models (Hayashi and Sakai, 2011), and both alcoholic hepatitis and cirrhosis are associated with distinct patterns of chemokine expression such as CCL8, CCL2, chemokine C-C motif ligand 3 (CCL3, also referred to macrophage inflammatory protein-1 alpha) and chemokine C-C motif ligand 4 (CCL4, macrophage inflammatory protein-1 beta) (Afford et al., 1998).

These findings confirm the existence of a close interaction between inflammatory signals from peripheral tissues (e.g., liver) and neuroinflammation through the blood stream and the blood-brain barrier (Banks, 2005). In line with these observations, we reported recently that plasma levels of CXCL12 and chemokine C-X₃-C motif ligand 1 (CX₃CL1, also referred to fractalkine) are correlated to cocaine symptom severity, which allows stratifying the cocaine addicts in patients with different incidence of comorbid psychiatric disorders (Araos et al., 2014; Pedraz et al., 2015). However, in the case of alcohol use disorders plasma chemokines have been evaluated almost exclusively in the context of alcoholic hepatitis (Gao and Bataller, 2011; Hayashi and Sakai, 2011). Taking into account all these observations, it is feasible to hypothesize that the chronic use of drugs of abuse leads to progressive changes in the neurobiology and behavior that might be mediated not only by the innate immune system, but also by the coordinated actions of

chemokines. The impact of these chemokine-mediated responses in the brain might contribute to the addicted phenotype and to the high prevalence of psychopathologies observed in addicts (Crews et al., 2011).

In the present study, we tested the hypothesis that lifetime alcohol use disorder (AUD) is associated with altered circulating chemokine concentrations that could be observed during abstinence in male and female patients. Furthermore, variables associated with alcohol addiction (i.e., abstinence, liver and/or pancreas diseases and criteria for AUD) and psychiatric comorbidity (other substance use disorders and mental disorders) could be also associated with alterations in the expression of certain chemokines in the plasma of patients with AUD in outpatient treatment. Additional studies in rats were performed to test the impact of alcohol administration on the chemokine expression, exploring also the combined association of stress and alcohol exposure.

MATERIALS AND METHODS

1 Participants and recruitment

The present cross-sectional study was performed in a total of 140 White Caucasian subjects who were divided into alcohol and control groups. Eighty-five abstinent subjects diagnosed with AUD (alcohol abuse or dependence) were recruited from outpatient programs for alcoholism at *Hospital Universitario 12 de Octubre* in Madrid (Spain) for a period of 18 months (November 2013- May 2015). Fifty-five healthy individuals with no history of substance use disorders or pathological use of substances were matched with the alcohol group for age, sex ratio and body mass index (BMI). The average participant was a man (65%) of 46.6 years old and a BMI of 25.5 kg/m².

The participants in the alcohol group had to meet eligibility criteria based on: A) *Inclusion criteria*: age ≥ 18 years up to 60 years of age, lifetime AUD, and at least 4 weeks of abstinence before testing; B) *Exclusion criteria*: presence of infectious diseases, incapacitating cognitive alterations to complete psychiatric interviews, and pregnancy for female participants. A breathalyzer was used daily for estimating blood alcohol content from a breath sample. Because of high incidence of alcohol-induced diseases in accessory organs (liver and pancreas), we included these individuals in the alcohol group. A description of the sample is presented in **Table 1**.

AUD patients were being treated with pharmacological approaches and psychosocial techniques. Seventy-five subjects were treated during the last year with disulfiram (N=61), antidepressants (N=35), anxiolytics (N=26), anticonvulsants (N=29) and antipsychotics (N=7).

2 Ethics statement

Written informed consent was obtained from each participant after a complete description of the study and discussing any question or issue. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the *CEI Provincial de Málaga* and *Hospital Universitario 12 de Octubre* in accordance with the 'Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects' adopted in the Declaration of Helsinki by the World Medical Association (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013), Recommendation No.R (97) 5 of the Committee of Ministers to Member States on the Protection of Medical Data (1997) and Spanish data protection act (*Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, LOPD*)

3 Clinical assessments

Patients from outpatient programs for alcoholism were evaluated according to 'Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition-Text Revision' (DSM-IV-TR) criteria, using the Spanish version of the 'Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases' (PRISM) (Torrens et al., 2004). Diagnoses were made using two time-frames: 'current' (criteria were met within the past year) and 'past' (criteria were met before the previous 12 months). Lifetime prevalence, taking into accounts both current and past diagnoses, was used to present the frequency of substance use disorders and other mental disorders. DSM-IV-TR criteria for substance dependence and abuse were used to diagnose substance use disorders and determine the severity of substance use disorders (Pavon et al., 2013; Araos et al., 2014).

Control subjects were initially evaluated by PRISM (for substance screening and abuse and dependence) and subsequently by the Spanish version of the 'Composite International Diagnostic Interview' (CIDI) to detect psychiatric disorders (Robins et al., 1988). All the interviews were performed by experienced psychologists who had received both PRISM and CIDI training.

4 Collection of plasma samples

Blood samples were obtained in the morning (09:00-11:00 h AM) after fasting for 8-12 h (previous to the psychiatric interviews). Venous blood was extracted into 10 mL K₂-EDTA tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and was immediately processed to obtain plasma. Blood samples were centrifuged at 2 200 ×g for 15 min (4°C) and individually assayed for detecting infectious diseases by 3 rapid tests for HIV (HIVTOP®), hepatitis B (HBVTOP®) and hepatitis C (HCVTOP®) purchased from ALL.DIAG (Strasbourg Cedex, France). Samples displaying infection were discarded following safety protocols. Plasma samples were individually characterized, registered and stored at -80°C until further analyses.

5 Multiplex immunoassays

Chemokines were chosen based on previous studies about inflammatory mediators and psychiatric disorders and addiction (Araos et al., 2014). A Bio-Plex Suspension Array System 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to quantify chemokine concentrations in plasma with a Procarta Immunoassay Kit using polystyrene beads and an appropriate diluent Plasma Standard Diluent Kit (Affymetrix-Panomics, Santa Clara, CA, USA). This method of analysis is based on the Luminex technology and a human chemokine 6-plex panel was used to simultaneously detect the following analytes: CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1), CX₃CL1 (fractalkine), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α) and CCL11 (eotaxin-1). The measurements of these analytes in plasma were performed following the manufacturer's instructions (Araos et al., 2014). Raw data were analyzed using the Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Data are expressed as pg of protein/mL of plasma.

6 Animals

Animal studies were conducted on 5-8 week-old male Wistar rats (Charles River Laboratories España S.A., Barcelona, Spain) weighing 200-250 g at the beginning of the experiments. Rats were kept in clear plastic

cages under a 12 h light/dark cycle (lights off at 8:00 PM) in a room at ambient temperature (23°C) and humidity (55%) in the Animal Resource Center at the University of Málaga (Spain). Unless otherwise indicated, water and chow pellets were available *ad libitum* throughout the course of these studies.

7 Ethics Statements

Experiments and procedures were conducted under strict adherence to the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and with Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004). All efforts were made to minimize unnecessary suffering. All protocols were approved by the Committee on the Ethics of Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

8 Experimental Procedures in rats

For ethanol experiments, rats were accustomed to the experimental conditions including handling and intragastric gavage (i.g.) procedure for a period of 1 week using saline. Rats were gavaged daily with a solution of ethanol (3 g/kg in saline) or saline as vehicle during 4 weeks. An additional group of rats were individually restrained for a period of 90 min in a Plexiglas cylindrical restrainer (diameter x length: 6 cm x 20 cm) with breathing holes in a separate testing room 48 h before beginning the ethanol or saline i.g. treatment.

All rats were sacrificed by decapitation 2 weeks after the last ethanol or saline i.g. session in a room provided with low-intensity white noise. Blood, liver and spleen samples were collected. Blood was centrifuged (2,000xg for 15 min) and the plasma kept at -80°C for further analysis.

9 Immunoassay analysis

CXCL12 (SDF-1), CX₃CL1 (fractalkine) and CCL11 (eotaxin-1) were measured in rat plasma with commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits in 96-well plate format following the manufacturer's instructions: ELISA Kit for Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF1) (product #: SEA122Ra; Cloud-Clone Corp., Wuhan, Hubei, PR China), Rat Fractalkine ELISA Kit (CX3CL1) (product #: ab100760; Abcam, Cambridge, UK) and Rat Eotaxin 1 (Eotaxin 1/CCL11/ECF) ELISA Kit (product #: CSB-E07319r; Cusabio, College Park, MD, USA). The plates were read at 450 nm within 30 min at a set wavelength of 540 nm or 570 nm. Data are expressed as ng of protein/mL of plasma.

10 Statistical analyses

All clinical data in the tables are expressed as number and percentage of subjects [N (%)] or mean and standard deviation of concentrations [mean (SD)]. The significance of differences in categorical and normal continuous variables was determined using Fisher's exact test (Chi-square test) and Student's t-test, respectively.

Statistical analysis of chemokine concentrations was performed using multiple analysis of covariance (ANCOVA) to indicate the relative effect of explanatory variables and their interactions on the chemokine expression in the plasma, controlling for additional covariates. Log(10)-transformation was used to ensure statistical assumptions for positive skewed distributions. The *post hoc* comparisons in ANCOVA were performed using Sidak's correction test. Estimated marginal means [95% confidence intervals (95% CI)] of chemokine concentrations were expressed and represented in the figures after back-transformation if that was the case. In addition, correlation analyses were performed using the Pearson's coefficient (*r*). Regarding data from rat studies, Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) were conducted for statistical analyses. Chemokine concentrations in rat plasma are expressed as mean and standard error of the mean (SEM). A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were

performed using the Graph-Pad Prism version 5.04 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and IBM SPSS Statistical version 22 software (IBM, Armonk, NY, USA).

In review

RESULTS

1 Plasma chemokine concentrations in abstinent AUD patients and controls

The impact of lifetime diagnosis of AUD on the plasma levels of chemokines in men and women was investigated using a two-way ANCOVA with 'history of AUD' and 'sex' (N=92 men and N=48 women) as factors, and 'age' and 'BMI' as covariates. Concentrations were examined to ensure that statistical assumptions were met and a base-10 logarithmic transformation of chemokine concentrations was conducted for CXCL8, CXCL12, CX₃CL1, CCL2 and CCL3. Estimated marginal means for 'history of AUD' were represented after back-transformation in **Figure 1**.

Plasma concentrations of CXC chemokines (i.e., CXCL8 and CXCL12) were differentially affected. Thus, although plasma CXCL8 concentrations were not affected by 'history of AUD' (**Figure 1A**), we observed a main effect of this factor on CXCL12 concentrations ($F_{(1,129)}=11.589$, $p<0.001$) (**Figure 1B**). Consequently, a significant reduction in plasma CXCL12 concentrations was detected in the alcohol group compared to the control group [285.76 (95% CI=266.07-307.61) pg/mL and 349.95 (95% CI=319.15-384.59) pg/mL, respectively].

CX₃CL1 had an expression profile similar to that observed for CXCL12. Therefore, plasma CX₃CL1 concentrations were also significantly affected by 'history of AUD' ($F_{(1,129)}=6.124$, $p=0.015$) (**Figure 1C**) and a significant decrease in the plasma concentrations was also observed in the alcohol group compared to the control group [4.592 (95% CI=4.140-5.105) pg/mL and 5.689 (95% CI=4.966-6.516) pg/mL, respectively].

Regarding the CC chemokine expression (i.e., CCL2, CCL3 and CCL11), plasma concentrations were not affected by 'history of AUD' as observed in the **Figures 1D-F**. However, the statistical analysis revealed a

main effect of 'sex' on CCL3 concentrations ($F_{(1,129)}=6.679$, $p=0.011$) and a significant interaction between 'history of AUD' and 'sex' on CCL11 concentrations ($F_{(1,129)}=4.922$, $p=0.028$) (**Figure S1**). Plasma CCL3 concentrations were higher in women than men with no distinction between both alcohol and control groups. In the case of CCL11, paired comparisons revealed that CCL11 concentrations were decreased in women compared to men but only in the alcohol group ($p<0.001$). Furthermore, the 'age' was significantly related to CCL11 concentrations ($F_{(1,129)}=14.969$, $p<0.001$) and correlation analysis indicated a positive association between 'age' and CCL11 concentrations ($r=+0.299$, $p<0.001$) in the total sample. Additional correlation analysis was conducted according to each factor ('history of AUD' or 'sex') and we observed an enhanced association in the control group ($r=+0.423$, $p=0.002$) and in the male participants ($r=+0.384$, $p=0.001$).

2 Alcohol-related variables and plasma chemokine concentrations in abstinent AUD patients

We evaluated the relative effects of variables associated with AUD and their interactions on chemokine concentrations in the alcohol group using a two-way ANCOVA. The independent variables that we included were as follows: alcohol-induced 'liver and pancreas diseases' (N=20 disease and N=85 no disease), 'sex' (N=58 men and N=27 women), 'AUD symptom severity', length of 'abstinence' and 'age'. For all analyses, 'psychiatric medication' was included as confounding variable. All variables were examined to ensure that statistical assumptions were met.

'AUD symptom severity', length of 'abstinence' and 'age' were fixed at the following mean values: 6.9 (SD=2.3) criteria for AUD, 9.2 (SD=11.8) months of abstinence, and 47.2 (SD=7.3) years. Plasma concentrations of CXCL12, CX₃CL1, CCL3 and CCL2 were not affected by any of the variables that were evaluated in abstinent AUD patients. However, we found significant effects on CXCL8 and CCL11 concentrations.

CXCL8 concentrations were significantly affected by 'liver and pancreas diseases' ($F_{(1,77)}=11.409$, $p<0.001$) but there was a disordinal interaction between 'liver and pancreas diseases' and 'sex' ($F_{(1,77)}=5.773$, $p=0.019$) (**Figure 2A**). Thus, multiple paired comparisons revealed a significant increase in CXCL8 concentrations in women diagnosed with alcohol-induced diseases (N=5) compared to female patients with no diseases (N=22) ($p<0.05$). In addition, 'psychiatric medication' was significantly related to CXCL8 concentrations ($F_{(1,27)}=6.500$, $p=0.013$).

Regarding CCL11, there was a main effect of 'sex' on CCL11 concentrations ($F_{(1,77)}=8.298$, $p=0.005$) with no other main effect or interaction between 'sex' and 'diseases' (**Figure 2B**). Estimated means indicated that male abstinent patients displayed higher CCL11 concentrations than female patients [43.35 (95% CI=39.90-46.99) pg/mL and 32.21 (95% CI=27.93-37.07) pg/mL, respectively]. Furthermore, we detected a significant effect of 'abstinence' ($F_{(1,77)}=4.239$, $p=0.041$) but there was no significant correlation between CCL11 concentrations and length of abstinence. Similar to previous analysis of CCL11 concentrations in the total sample, the 'age' was also significantly related to CCL11 concentrations ($F_{(1,77)}=8.891$, $p=0.004$).

3 Psychiatric comorbidity and plasma chemokine concentrations in abstinent AUD patients

Since chemokines have been linked to psychiatric disorders, we studied the effect of psychiatric comorbidity on plasma chemokine concentrations in the alcohol group. In fact, the alcohol group had a high prevalence of psychiatric comorbidity (76%) and we divided abstinent AUD patients into comorbid and non-comorbid patients according to lifetime diagnosis of substance use disorders (45%) and mental disorders (72%) for characterization (**Table 2**).

The impact of psychiatric comorbidity on chemokine expression was analyzed using a two-way ANCOVA with the following factors: the diagnosis of 'comorbid substance use disorders' or diagnosis of 'comorbid

mental disorders' and 'sex'. These independent variables were controlled for 'age'. For all analyses, 'psychiatric medication' was also included as confounding variable. All variables were examined to ensure that statistical assumptions were met.

3.1 Comorbid substance use disorders and plasma chemokine concentrations

Plasma concentrations of chemokines were not found to be affected by any of the variables evaluated, with the exception of CCL11. We only observed a main effect of 'sex' ($F_{(1,79)}=11.132$, $p=0.001$) on CCL11 concentrations (**Figure S2A**) but no effect of 'comorbid substance use disorders' or interaction (**Figure 3A**). As expected, 'age' was also significantly related to CCL11 concentrations ($F_{(1,79)}=5.572$, $p=0.021$).

3.2 Comorbid mental disorders and plasma chemokine concentrations

Regarding the diagnosis of comorbid mental disorders, we observed significant effects on CCL11 concentrations. Thus, statistical analysis revealed a significant main effect of 'comorbid mental disorders' ($F_{(1,79)}=7.559$, $p=0.007$) on CCL11 concentrations as shown in **Figure 3B**, and patients diagnosed with comorbid mental disorders had decreased CCL11 concentrations relative to non-comorbid patients [36.79 (95% CI=33.59-39.99) pg/mL and 44.58 (95% CI=39.46-49.70) pg/mL, respectively]. Again, there was a significant effect of 'sex' ($F_{(1,79)}=6.524$, $p=0.013$) on CCL11 concentrations (**Figure S2B**) and the covariate 'age' was also related to CCL11 concentrations ($F_{(1,79)}=6.752$, $p=0.011$).

4 Comorbid mental disorders and plasma CCL11 concentrations in abstinent AUD patients

As a continuation of the effects of comorbid mental disorders on CCL11 expression, we evaluated the contribution of the most prevalent mental disorders: mood disorders (N=42), anxiety (N=16), psychotic disorders (N=6), personality disorders (N=21) and ADHD (N=22).

We analyzed the effects of these psychiatric disorders on CCL11 including 'sex' and controlling for 'age' and 'psychiatric medication' but we have ignored the significance of 'sex' for clarity and to prevent repetitive outputs (**Figure 3C**). Thus, a two-way ANCOVA revealed that CCL11 concentrations were significantly affected by 'mood disorders' ($F_{(1,79)}=4.627$, $p=0.034$) and the estimated CCL11 mean was lower in patients diagnosed with mood disorders than in patients with no mood disorders [35.92 (95% CI=32.15-39.68) pg/mL and 41.28 (95% CI=37.34-45.23) pg/mL, respectively]. Plasma CCL11 concentrations were also affected by 'anxiety' ($F_{(1,79)}=4.941$, $p=0.028$) and the estimated marginal mean of CCL11 was lower in patients diagnosed with lifetime anxiety than in patients with no anxiety [32.71 (95% CI=26.55-38.88) pg/mL and 39.86 (95% CI=36.19-42.93) pg/mL, respectively]. Therefore, female abstinent patients diagnosed with lifetime anxiety disorder displayed the lowest concentrations of CCL11 [26.38 (95% CI=16.47-36.29) pg/mL].

5 Plasma chemokine concentrations in abstinent rats exposed to ethanol

Because only CXCL11 and CX₃CL1 concentrations were found to be altered in the plasma of abstinent AUD patients relative to the control group in humans, we tested whether these chemokines were also affected by ethanol administration in abstinent Wistar rats. We included only male rats to prevent any effect of 'sex' or interaction between 'sex' and 'ethanol exposure'. Since CCL11 was linked to anxiety and depression, we included a group of animals stressed by restraint before alcohol exposure, in order to investigate the potential link of this chemokine with emotional behavior.

Two weeks after the last ethanol administration alcohol-exposed rats had lower CXCL12 concentrations than vehicle-treated rats, resulting in a significant decrease ($t_{(38)}=2.99$, $p=0.005$) (**Figure 4A**). However, we observed no significant differences in plasma CX₃CL1 concentrations between both groups (**Figure 4B**).

In humans, we found that the CCL11 expression was significantly affected by lifetime mental disorders, especially mood disorders and anxiety, and there was a strong effect of other independent variables such as 'sex' and 'age'. Therefore, we investigated whether these effects on CCL11 concentrations were also observed in male Wistar rats exposed to acute stress induced by immobilization and treated with ethanol. As shown in **Figure 4C**, a two-way ANOVA revealed a main effect of 'ethanol exposure' ($F_{(1,73)}=27.02$, $p<0.001$) with higher CCL11 concentrations in alcohol-exposed rats compared to vehicle rats, and a main effect of early 'stress' ($F_{(1,73)}=6.975$, $p<0.01$) with higher CCL11 concentrations in rats exposed to stress compared to rats without restraint.

In review

DISCUSSION

While the association of immune signaling and psychiatric disorders is widely investigated, its association with addiction is still a field under exploration. We lack essential information concerning how immune signaling in the brain contributes to the neuroadaptations imposed by chronic substance use. This is especially relevant in the case of alcohol that can directly activate neuroimmune processes (Pascual et al., 2015). In the present study, we measured plasma chemokines in a well-phenotyped cohort of subjects with AUD in abstinence, treated in an outpatient setting. This cohort was characterized for the presence of psychiatric comorbidity. The main findings are as follows: i) Abstinent AUD patients had lower concentrations of CXCL12 and CX₃CL1 compared to control subjects whereas CCL11 concentrations were strongly decreased in female AUD patients; ii) CXCL8 concentrations were higher in patients with cirrhosis, steatosis or pancreatitis, particularly in female AUD patients; iii) CCL11 concentrations were lower in AUD patients with comorbid mental disorders in the alcohol group (i.e., mood and anxiety disorders); iv) It is also remarkable the existence of a strong and permanent effect of sex and age on plasma CCL11 concentrations in the alcohol group throughout the present study; and v) Studies conducted in male rats exposed to repeated ethanol revealed similar changes in plasma CXCL12 concentrations than those observed in humans during abstinence and vi) rats exposed to repeated ethanol and early stress (restraint) displayed changes in CCL11 concentrations, although the changes were opposite to those observed in humans.

1 Abstinent AUD patients have altered CXCL12/SDF-1 and CX₃CL1/Fractalkine concentrations in the plasma

Patients with a history of AUD displayed lower plasma concentrations of CXCL12 and CX₃CL1 relative to control subjects with no pathological use of substances or substance use disorders. Various studies have

reported an association between both chemokines and abused drugs, mainly with cocaine. Recently, our group has reported a decrease in the plasma CXCL12 concentrations and a positive correlation between CX₃CL1 concentrations and the cocaine symptom severity in abstinent cocaine-addicted subjects from outpatient setting (Araos et al., 2014; Pedraz et al., 2015). In agreement with these clinical data, changes in the plasma concentrations of both chemokines have been observed in mice exposed to cocaine (Pedraz et al., 2015). However, another study in chronic cocaine users showed increased CXCL12 concentrations in the moment of admission for treatment, although they were decreased after one month of cocaine withdrawal (Saez et al., 2011).

Unlike cocaine, there are scarce exploratory studies examining the circulating concentrations of CXCL12 after alcohol exposure. In fact, these studies conducted in humans (Chiva-Blanch et al., 2014) and mice (Gil-Bernabe et al., 2011) have reported high circulating concentrations of CXCL12 after moderate alcohol consumption. By contrast, here we found low concentrations of CXCL12 in AUD patients but also in rats exposed to repeated ethanol after 1 week of abstinence. Regarding plasma CX₃CL1, most studies on the effects of alcohol are focused on the CNS (Gofman et al., 2014; Sokolowski et al., 2014) and pancreas (Yasuda et al., 2008; Uchida et al., 2013) but a recent study has reported elevated concentrations of CX₃CL1 in the serum of mice treated chronically (5 months) with ethanol (Pascual et al., 2015), which is in opposition to our data in AUD patients. It is important to indicate that species, doses and intensity of the exposure were not comparable in between these studies and that further research is needed to understand the time-course of the changes in chemokines in plasma after acute and chronic alcohol exposure.

Therefore, although increased circulating levels of CXCL12 and CX₃CL1 after alcohol exposure are opposed to the present data, there are marked differences regarding the time of the last alcohol exposure (abstinence) and the AUD severity in the clinical studies. Our study has been performed in patients diagnosed with AUD in a prolonged abstinence (about 9 months) and a history of heavy alcohol

consumption, whereas the above cited studies in humans were performed in high cardiovascular risk patients reporting moderate alcohol consumption. This discrepancy might indicate that both chemokines fluctuate regarding the duration of abstinence and intensity of alcohol use.

In addition to CXCL12 and CX₃CL1, differences in CCL11 concentrations were found between men and women in the alcohol group, which indicated the presence of a sexual dimorphism in the circulating CCL11 concentrations in response to a history of pathological alcohol exposure and/or AUD.

2 Age and sex differences influence CCL3/MIP-1 α and CCL11/Eotaxin-1 concentrations in the plasma

Age and sex are critical variables in the expression of inflammatory signals (Czlonkowska et al., 2006; Harry, 2013; Larsson et al., 2015) and for this reason we have included both independent variables in the statistical analysis. Here, we show that CCL3 and especially CCL11 were affected by these physiological variables. Regarding CCL3, this is the first time that sex differences are showed in the circulating expression of this chemokine. In contrast, a growing number of clinical studies have described the association of CCL11 with age and sex (Targowski et al., 2005; Shurin et al., 2007). For example, Targowski and colleagues reported that healthy young subjects (25-34 years) had lower serum levels of CCL11 than older participants (35-55 years). They also showed that there were sex differences with decreased CCL11 concentrations in women (Targowski et al., 2005). Similarly, another study in healthy subjects (40-80 years) demonstrated that the serum levels of CCL11 were gradually increased with age but sex differences were not found, suggesting that sex differences might be abolished with increasing age (Shurin et al., 2007). Our results are in accordance with these studies because we found a significant effect of age on CCL11 concentrations that resulted in a positive correlation, particularly in the control group. As previously mentioned, we observed no differences in CCL11 concentrations in male and female controls

but a clear decrease in the expression of this chemokine was found in female compared to male AUD patients. Therefore, alcohol abuse and/or dependence could induce changes in CCL11 concentrations interfering in the expected effects of age and emphasizing sex differences.

3 Liver and pancreas diseases influence CXCL8 concentrations in the plasma of abstinent AUD patients

The influence of variables such as the AUD severity, length of abstinence and diagnosis of diseases in accessory organs in chemokines was evaluated in the alcohol group. Previously, we have reported an association between plasma concentrations of CXCL12 and CX₃CL1 and cocaine symptom severity in abstinent cocaine addicts (Araos et al., 2014) but none of these chemokines were affected by AUD severity. In fact, despite CXCL12 and CX₃CL1 concentrations were found to be decreased in the alcohol group, none of the alcohol use-related variables had a significant effect. However, alcohol-induced diseases in accessory organs influenced strongly the plasma expression of CXCL8. Thus, the diagnosis of cirrhosis, hepatitis or pancreatitis that reached about a 24% of AUD patients was associated with elevated CXCL8 concentrations. In line with these data, clinical and preclinical studies have showed that increased concentrations of CXCL8 are involved in the pathogenesis of alcoholic liver and pancreas diseases (Szuster-Ciesielska et al., 2000; Swiatkowska-Stodulska et al., 2006). Therefore, the present study confirms the role of CXCL8 as a putative indicator of pancreatitis and liver disease.

4 Psychiatric comorbidity influences CCL11/eotaxin-1 concentrations in the plasma of abstinent AUD patients

Most studies on CCL11 are associated with allergy and asthma because this chemokine has been identified as a potential biomarker for the diagnosis and assessment of asthma severity and control (Wu et

al., 2014) but there are no studies on the role of CCL11 in addictive disorders. In our exploratory approach, we studied the potential effect of the presence of psychiatric comorbidity on chemokine concentrations on account of the high rate of prevalence in the alcohol group. As expected, abstinent AUD patients showed a elevated psychiatric comorbidity and about 40% of patients were diagnosed with abuse and/or dependence of other psychoactive substances as well as other psychiatric disorders.

While a pathological use of other substance(s) and alcohol had no effects on any of the chemokines evaluated, the diagnosis of mental disorders had a primary effect on the plasma expression of CCL11. Several studies have reported the association between blood levels of CCL11 and psychiatric disorders, for example in schizophrenia (Teixeira et al., 2008), bipolar disorders (Barbosa et al., 2013;Panizzutti et al., 2015), major depression (Grassi-Oliveira et al., 2012) and psychopathologies with suicidal ideation (Grassi-Oliveira et al., 2012), but there are no studies in a context of substance use disorders. Our data revealed a decreased expression of CCL11 concentrations in abstinent AUD patients diagnosed with non-substance mental disorders. Remarkably, this decrease was observed to be more enhanced in women. After evaluating common psychiatric disorders separately, mood disorders and anxiety confirmed their association with lower concentrations of CCL11 in abstinent AUD patients. Evidence points to a strong association between high concentrations in blood CCL11 and the decline in neurogenesis and cognitive impairments (Villeda et al., 2011), and this fact is observed in aged subjects. Accordingly, we have described a clear association between CCL11 concentrations and age but the decreased concentrations observed in comorbid AUD patients are opposite to previous studies in psychiatric disorders, which reported increased concentrations of CCL11 in the serum of patients (Teixeira et al., 2008;Grassi-Oliveira et al., 2012;Barbosa et al., 2013;Magalhaes et al., 2014;Panizzutti et al., 2015). However, none of the referred studies were performed in the context of substance use disorders and several differences are found with respect to the present study.

Interestingly, a clinical study in young adults from general population by Magalhaes and colleagues reported no effects of the diagnosis of substance use disorders as predictor of CCL11 concentrations although both bipolar and depression disorders and sex influenced significantly the expression of this chemokine (Magalhaes et al., 2014), which is in agreement with the present study in AUD patients. However, the presence of both bipolar and major depression disorders was associated with higher concentrations of CCL11 in contrast to our clinical data. Regarding the association between anxiety disorders and CCL11 concentrations, we found no studies in addicted subjects and only a study in anxious subjects with obsessive-compulsive disorder has examined this chemokine in the plasma but no changes were reported (Fontenelle et al., 2012). Nevertheless, in the present study we found differences between human and rats. Thus, while anxious AUD patients had lower CCL11 concentrations, ethanol-exposed rats with a previous stress episode by restraint had higher levels of CCL11 in the plasma. It is important to note that at the time of sampling all patients were receiving treatment and the impact that both, the pharmacological therapy and the psychological interventions, may have on plasma CCL11 concentrations cannot be assessed taking in consideration the cross-sectional design of the study. Indeed, this potential impact will be studied in future longitudinal studies.

5 Limitations and future perspectives

The present findings support the importance of monitoring chemokines in the context of complex disorders such as substance use disorders including AUD. We are aware of the limitations of this exploratory study, which need to be borne in mind in interpreting the data. First, the validity of the results presented here needs to be assessed in a larger sample of patients and include psychiatric patients with no history of substance use disorders or pathological use of substances. Second, additional studies to determine plasma chemokines in active alcohol users are necessary to test the effect of alcohol on these inflammatory signals, controlling for confounding variables like active psychopharmacological medications. Third, the

impact of sex differences in the plasma concentrations of chemokines, such as CCL3 and CCL11, has to be characterized and evaluated in the context of psychiatric comorbidity focusing efforts on recruiting female participants to increase the statistical power. Although CCL11 could be proposed as a potential indicator of psychiatric comorbidity in abstinent subjects with AUD, there are not data about other drugs of abuse. Further clinical and preclinical research is necessary to elucidate the role of chemokines and sex in the aetiology of alcoholism and psychiatric disorders.

In review

LIST OF NON-STANDARD ABBREVIATIONS

AUD: Alcohol Use Disorders;

CCL11/eotaxin-1: Chemokine (C-C motif) ligand 11/eotaxin-1;

CCL2/MCP-1: Chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemotactic protein-1;

CCL3/MIP-1 α : Chemokine (C-C motif) ligand 3/ Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha;

CXCL8/IL-8: Chemokine (C-X-C motif) ligand 8/interleukin-8;

CXCL12/SDF-1: Chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1;

CX₃CL1/fractalkine: Chemokine (C-X₃-C motif) ligand 1/fractalkine;

DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition-Text Revision;

PRISM: Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors state no competing financial, commercial interests or other relationships that might be perceived to influence the results and discussion reported in the present work.

AUTHOR AND CONTRIBUTORS

FRF, FJP and AS were responsible for the study concept and design. NGM, GP, PA, MP and GR coordinated recruitment of participants. NGM, PA and MP contributed to the acquisition of psychiatric data by means of interviews and generated the database. AS, EC-O and JD processed, registered and stored human blood samples. VB, JAC and JA supervised and performed the quantification of chemokines in human plasma. LS-M, AG, JD, DS and AS performed rat studies and ELISAs. FJP, AS and PR-S assisted with data analysis and interpretation of findings. FRF and FJP drafted the manuscript. MT, JA and GR provided critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors critically reviewed content and approved the version for publication.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study has been supported by RETICS Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0021) funded by Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU); Research projects funded by Ministerio de Economía y Competitividad and ISC-III (PI13/02261 and PI16/01953); Research projects funded by Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad and Plan Nacional sobre Drogas (049/2009 and 049/2013); Research project funded by Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía and ERDF-EU (CTS-433); Research projects funded by Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía (PI0228-2013 and PI0823-2012). AS and FJP hold Miguel Servet research contracts funded by ISC-III and ERDF-EU (CP14/00173

and CP14/00212, respectively). PR-S holds a 'Río Hortega' research contract funded by ISC-III and ERDF-EU (CM13/0115). EC-O holds a 'Sara Borrell' research contract funded by ISC-III and ERDF-EU (CD12/00455).

The authors thank the participants and the psychiatry research support staff for their generosity and interest to make this study possible.

In review

REFERENCES

- Afford, S.C., Fisher, N.C., Neil, D.A., Fear, J., Brun, P., Hubscher, S.G., and Adams, D.H. (1998). Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 186, 82-89.
- Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., Garcia-Marchena, N., Campos-Cloute, R., Ruiz, J.J., Romero, P., Suarez, J., Baixeras, E., De La Torre, R., Montesinos, J., Guerri, C., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J., Martinez-Riera, R., Torrens, M., Chowen, J.A., Argente, J., Mason, B.J., Pavon, F.J., and Rodriguez De Fonseca, F. (2014). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol*.
- Banks, W.A. (2005). Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des* 11, 973-984.
- Barbosa, I.G., Rocha, N.P., Bauer, M.E., De Miranda, A.S., Huguet, R.B., Reis, H.J., Zunszain, P.A., Horowitz, M.A., Pariente, C.M., and Teixeira, A.L. (2013). Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263, 159-165.
- Coller, J.K., and Hutchinson, M.R. (2012). Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther* 134, 219-245.
- Crews, F.T., Zou, J., and Qin, L. (2011). Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1, S4-S12.
- Czlonkowska, A., Ciesielska, A., Gromadzka, G., and Kurkowska-Jastrzebska, I. (2006). Gender differences in neurological disease: role of estrogens and cytokines. *Endocrine* 29, 243-256.
- Chiva-Blanch, G., Condines, X., Magraner, E., Roth, I., Valderas-Martinez, P., Arranz, S., Casas, R., Martinez-Huelamo, M., Vallverdu-Queralt, A., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventos, R.M., and Estruch, R. (2014). The non-alcoholic fraction of beer increases stromal cell derived factor 1 and the number of circulating endothelial progenitor cells in high cardiovascular risk subjects: a randomized clinical trial. *Atherosclerosis* 233, 518-524.
- Fontenelle, L.F., Barbosa, I.G., Luna, J.V., De Sousa, L.P., Abreu, M.N., and Teixeira, A.L. (2012). A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Compr Psychiatry* 53, 797-804.
- Gao, B., and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141, 1572-1585.
- Gil-Bernabe, P., Boveda-Ruiz, D., D'alessandro-Gabazza, C., Toda, M., Miyake, Y., Mifuji-Moroka, R., Iwasa, M., Morser, J., Gabazza, E.C., and Takei, Y. (2011). Atherosclerosis amelioration by moderate alcohol consumption is associated with increased circulating levels of stromal cell-derived factor-1. *Circ J* 75, 2269-2279.
- Gofman, L., Cenna, J.M., and Potula, R. (2014). P2X4 receptor regulates alcohol-induced responses in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 9, 668-678.
- Grassi-Oliveira, R., Brieztke, E., Teixeira, A., Pezzi, J.C., Zanini, M., Lopes, R.P., and Bauer, M.E. (2012). Peripheral chemokine levels in women with recurrent major depression with suicidal ideation. *Rev Bras Psiquiatr* 34, 71-75.
- Guyon, A., Skrzydelski, D., De Giry, I., Rovere, C., Conductier, G., Trocetto, J.M., Dauge, V., Kitabgi, P., Rostene, W., Nahon, J.L., and Melik Parsadaniantz, S. (2009). Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* 162, 1072-1080.

- Harry, G.J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther* 139, 313-326.
- Hayashi, H., and Sakai, T. (2011). Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G729-738.
- He, J., and Crews, F.T. (2008). Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* 210, 349-358.
- Kane, C.J., Phelan, K.D., Douglas, J.C., Wagoner, G., Johnson, J.W., Xu, J., and Drew, P.D. (2013). Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in aged mice. *J Neuroinflammation* 10, 66.
- Larsson, A., Carlsson, L., Gordh, T., Lind, A.L., Thulin, M., and Kamali-Moghaddam, M. (2015). The effects of age and gender on plasma levels of 63 cytokines. *J Immunol Methods*.
- Magalhaes, P.V., Jansen, K., Stertz, L., Ferrari, P., Pinheiro, R.T., Da Silva, R.A., and Kapczinski, F. (2014). Peripheral eotaxin-1 (CCL11) levels and mood disorder diagnosis in a population-based sample of young adults. *J Psychiatr Res* 48, 13-15.
- Oglodek, E.A., Szota, A., Just, M.J., Mos, D., and Araszkiewicz, A. (2014). Comparison of chemokines (CCL-5 and SDF-1), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4) and IL-6 levels in patients with different severities of depression. *Pharmacol Rep* 66, 920-926.
- Oglodek, E.A., Szota, A.M., Just, M.J., Mos, D.M., and Araszkiewicz, A. (2015). The MCP-1, CCL-5 and SDF-1 chemokines as pro-inflammatory markers in generalized anxiety disorder and personality disorders. *Pharmacol Rep* 67, 85-89.
- Panizzutti, B., Gubert, C., Schuh, A.L., Ferrari, P., Bristot, G., Fries, G.R., Massuda, R., Walz, J., Rocha, N.P., Berk, M., Teixeira, A.L., and Gama, C.S. (2015). Increased serum levels of eotaxin/CCL11 in late-stage patients with bipolar disorder: An accelerated aging biomarker? *J Affect Disord* 182, 64-69.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., and Gross, C.T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.
- Pascual, M., Balino, P., Aragon, C.M., and Guerri, C. (2015). Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology* 89, 352-359.
- Pavon, F.J., Araos, P., Pastor, A., Calado, M., Pedraz, M., Campos-Cloute, R., Ruiz, J.J., Serrano, A., Blanco, E., Rivera, P., Suarez, J., Romero-Cuevas, M., Pujadas, M., Vergara-Moragues, E., Gornemann, I., Torrens, M., De La Torre, R., and Rodriguez De Fonseca, F. (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol* 18, 955-969.
- Pedraz, M., Araos, P., Garcia-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suarez, J., Castilla-Ortega, E., Mayoral-Cleries, F., Ruiz, J.J., Pastor, A., Barrios, V., Chowen, J.A., Argente, J., Torrens, M., De La Torre, R., Rodriguez De Fonseca, F., and Pavon, F.J. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Front Psychiatry* 6, 17.
- Robins, L.N., Wing, J., Wittchen, H.U., Helzer, J.E., Babor, T.F., Burke, J., Farmer, A., Jablenski, A., Pickens, R., Regier, D.A., Sartorius, N., and Towle, L.H. (1988). The Composite International Diagnostic Interview - an Epidemiologic Instrument Suitable for Use in Conjunction with Different Diagnostic Systems and in Different Cultures. *Archives of General Psychiatry* 45, 1069-1077.
- Saez, C.G., Olivares, P., Pallavicini, J., Panes, O., Moreno, N., Massardo, T., Mezzano, D., and Pereira, J. (2011). Increased number of circulating endothelial cells and plasma markers of endothelial damage in chronic cocaine users. *Thromb Res* 128, e18-23.

- Salim, S., Chugh, G., and Asghar, M. (2012). Inflammation in anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88, 1-25.
- Shurin, G.V., Yurkovetsky, Z.R., Chatta, G.S., Tourkova, I.L., Shurin, M.R., and Lokshin, A.E. (2007). Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine* 39, 123-129.
- Sokolowski, J.D., Chabanon-Hicks, C.N., Han, C.Z., Heffron, D.S., and Mandell, J.W. (2014). Fractalkine is a "find-me" signal released by neurons undergoing ethanol-induced apoptosis. *Front Cell Neurosci* 8, 360.
- Stuart, M.J., and Baune, B.T. (2014). Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Stuart, M.J., Corrigan, F., and Baune, B.T. (2014). Knockout of CXCR5 increases the population of immature neural cells and decreases proliferation in the hippocampal dentate gyrus. *J Neuroinflammation* 11, 31.
- Swiatkowska-Stodulska, R., Bakowska, A., and Drobinska-Jurowiecka, A. (2006). Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit* 12, CR215-220.
- Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J., and Kandefer-Zerszen, M. (2000). Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 301-307.
- Targowski, T., Jahnz-Rozyk, K., Plusa, T., and Glodzinska-Wyszogrodzka, E. (2005). Influence of age and gender on serum eotaxin concentration in healthy and allergic people. *J Investig Allergol Clin Immunol* 15, 277-282.
- Teixeira, A.L., Reis, H.J., Nicolato, R., Brito-Melo, G., Correa, H., Teixeira, M.M., and Romano-Silva, M.A. (2008). Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 710-714.
- Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Perez-Dominguez, G., and Martin-Santos, R. (2004). Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry* 161, 1231-1237.
- Trecki, J., and Unterwald, E.M. (2009). Modulation of cocaine-induced activity by intracerebral administration of CXCL12. *Neuroscience* 161, 13-22.
- Trocello, J.M., Rostene, W., Melik-Parsadaniantz, S., Godefroy, D., Roze, E., Kitabgi, P., Kuziel, W.A., Chalon, S., Caboche, J., and Apartis, E. (2011). Implication of CCR2 chemokine receptor in cocaine-induced sensitization. *J Mol Neurosci* 44, 147-151.
- Uchida, M., Ito, T., Nakamura, T., Igarashi, H., Oono, T., Fujimori, N., Kawabe, K., Suzuki, K., Jensen, R.T., and Takayanagi, R. (2013). ERK pathway and sheddases play an essential role in ethanol-induced CX3CL1 release in pancreatic stellate cells. *Lab Invest* 93, 41-53.
- Umhau, J.C., Schwandt, M., Solomon, M.G., Yuan, P., Nugent, A., Zarate, C.A., Drevets, W.C., Hall, S.D., George, D.T., and Heilig, M. (2014). Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholics: support for a neuroinflammatory model of chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 38, 1301-1306.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.S., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., and Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90-94.
- Westin, K., Buchhave, P., Nielsen, H., Minthon, L., Janciauskiene, S., and Hansson, O. (2012). CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7, e30525.

- Wu, D., Zhou, J., Bi, H., Li, L., Gao, W., Huang, M., Adcock, I.M., Barnes, P.J., and Yao, X. (2014). CCL11 as a potential diagnostic marker for asthma? *J Asthma* 51, 847-854.
- Yasuda, M., Ito, T., Oono, T., Kawabe, K., Kaku, T., Igarashi, H., Nakamura, T., and Takayanagi, R. (2008). Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. *World J Gastroenterol* 14, 6488-6495.

In review

Table 1. Baseline socio-demographic characteristics in abstinent AUD patients and controls.

VARIABLE		GROUP		
		ALCOHOL N=85	CONTROL N=55	p value
Age [mean (SD)]	years	47.16 (7.27)	45.20 (9.97)	0.211 ^a
BMI [mean (SD)]	kg/m ²	25.69 (3.86)	24.82 (3.38)	0.177 ^a
Sex [N (%)]	Women Men	27 (31.8) 58 (68.2)	21 (38.2) 34 (61.8)	0.469 ^b
Marital status [N (%)]	Single Married/cohabiting Divorced/separated/Widowed	28 (32.9) 27 (31.8) 30 (35.3)	26 (47.3) 22 (40.0) 7 (12.7)	0.012 ^b
Education [N (%)]	≤ Primary/elementary ≥ Secondary	24 (28.2) 61 (71.8)	10 (18.2) 45 (81.8)	0.227 ^b
Occupation [N (%)]	Employed Unemployed	47 (55.3) 38 (44.7)	42 (76.4) 13 (23.6)	0.012 ^b
Psychological / psychiatric support [N (%)]	No Yes	0 (0.0) 85 (100)	52 (94.5) 3 (5.5)	<0.001 ^b
Abbreviations: BMI, body mass index ^(a) p-value from Student's t-test ^(b) p-value from Fisher's exact test or Chi-square test Bold numbers denote significant differences (p<0.05)				

Table 2. Baseline socio-demographic variables and psychiatric disorders in abstinent AUD patients grouped according to comorbidity.

VARIABLE		ALCOHOL N=85					
		A) COMORBID SUBSTANCE USE DISORDERS			B) OTHER COMORBID MENTAL DISORDERS		
		NO	YES	p value	NO	YES	p value
Participants [N (%)]		47 (55.3)	38 (44.7)	-	24 (28.2)	61 (71.8)	-
Age [mean (SD)]	years	48.9 (6.1)	45.1 (8.1)	0.017^a	47.8 (6.6)	46.9 (7.6)	0.621 ^a
BMI [mean (SD)]	kg/m ²	25.8 (3.8)	25.58 (3.9)	0.823 ^a	25.6 (3.6)	25.7 (4.00)	0.835 ^a
Sex [N (%)]	Women	20 (42.6)	7 (18.4)	0.021^b	6 (0.25)	21 (0.35)	0.450 ^b
	Men	27 (57.4)	31 (81.6)		18 (0.75)	40 (0.65)	
Liver and pancreas diseases [N (%)]	Steatosis	8 (17.0)	1 (2.6)	0.024^b	5 (20.8)	4 (6.6)	0.017^b
	Cirrhosis	5 (10.6)	1 (2.6)		4 (16.7)	2 (3.3)	
	Pancreatitis	4 (8.5)	1 (2.6)		2 (8.3)	3 (4.9)	
Lifetime alcohol use disorders [N (%)]	Abuse	1 (2.1)	4 (10.5)	0.109 ^b	0 (0.0)	5 (8.2)	0.220 ^b
	Dependence	5 (10.6)	1 (2.6)		1 (4.2)	6 (9.8)	
	Both	41 (87.2)	33 (86.8)		23 (95.8)	50 (82.0)	
Smoking [N (%)]	No	5 (10.6)	5 (13.2)	0.109 ^b	1 (4.2)	9 (14.8)	0.316 ^b
	Yes	34 (72.3)	28 (73.7)		20 (83.3)	42 (68.9)	
	Former smoker	8 (17.0)	5 (13.2)		3 (12.5)	10 (16.4)	
Other lifetime substance use disorders [N (%)]	No	47 (100.0)	0 (0.0)	-	20 (83.3)	27 (44.3)	0.001^b
	Yes	0 (0.0)	38 (100.0)		4 (16.7)	34 (55.7)	
	Cocaine	0 (0.0)	28 (73.7)	-	3 (12.5)	25 (41.0)	0.020^b
	Cannabis	0 (0.0)	15 (39.5)	-	2 (8.3)	13 (21.3)	0.214 ^b
	Heroin	0 (0.0)	3 (7.9)	-	0 (0.0)	3 (4.9)	0.555 ^b
	Sedatives	0 (0.0)	2 (5.3)	-	0 (0.0)	2 (3.3)	1.000 ^b
	Others	0 (0.0)	7 (18.4)	-	2 (8.3)	5 (8.2)	1.000 ^b
Common lifetime mental disorders [N (%)]	No	20 (42.6)	4 (10.5)	<0.001^b	24 (100.0)	0 (0.0)	-
	Yes	27 (57.4)	34 (89.5)		0 (0.0)	61 (100.0)	
	Mood	20 (42.5)	22 (57.9)	0.194 ^b	0 (0.0)	42 (68.9)	-
	Anxiety	7 (14.9)	9 (23.7)	0.404 ^b	0 (0.0)	16 (26.2)	-
	Psychosis	4 (8.6)	2 (5.3)	0.687 ^b	0 (0.0)	6 (9.8)	-
	Personality	5 (10.6)	16 (42.1)	0.001^b	0 (0.0)	21 (34.4)	-
	ADHD (childhood)	4 (8.5)	18 (47.4)	<0.001^b	0 (0.0)	22 (36.1)	-
Abbreviations: BMI, body mass index; ADHD, attention deficit hyperactivity disorder ^(*) p-value from Student's t-test. Age: t=2.47, df=83 ^(b) p-value from Fisher's exact test or Chi-square test Bold numbers denote significant differences (p<0.05)							

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Plasma chemokine concentrations in abstinent AUD patients and control subjects. A) CXCL8 (IL-8); B) CXCL12 (SDF-1); C) CX₃CL1 (fractalkine); D) CCL2 (MCP-1); E) CCL3 (MIP-1 α); and F) CCL11 (eotaxin-1) according to history of AUD and sex. Bars are estimated marginal means and 95% CI (pg/mL). Data were analyzed by two-way ANCOVA. (*) $p < 0.05$ and (*) $p < 0.001$ denote a significant main effect of history of AUD.**

Figure 2

Plasma concentrations of CXCL8 (IL-8) and CCL11 (eotaxin-1) in abstinent AUD patients according to the presence of liver and/or pancreas diseases and sex. A) CXCL8 (IL-8); and B) CCL11 (eotaxin-1). Bars are estimated marginal means and 95% CI (pg/mL). Data were analyzed by two-way ANCOVA. () $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ denote significant main effect of sex and liver/pancreas diseases. (+) $p < 0.05$ denotes interaction and significant differences compared to female no diseases subgroup.**

Figure 3

Plasma concentrations of CCL11 (eotaxin-1) in abstinent AUD patients according to psychiatric comorbidity. A) CCL11 (eotaxin-1) according to comorbid substance use disorders; B) CCL11 (eotaxin-1) according to comorbid mental disorders; and C) CCL11 (eotaxin-1) according to mood disorders, anxiety, psychotic disorders, personality disorders and ADHD. Bars are estimated marginal means and 95% CI (pg/mL). Data were analyzed by two-way ANCOVA. (*) $p < 0.05$ and () $p < 0.01$ denote significant main effect of mental disorders.**

Figure 4

Plasma concentrations of CXCL12 (SDF-1), CX₃CL1 (fractalkine) and CCL11 (eotaxin-1) in male Wistar rats exposed to repeated ethanol and acute stress. A) CXCL12 (SDF-1); and B) CX₃CL1 (fractalkine) concentrations were determined in rats exposed to ethanol (3 g/kg, i.g.) during 4 weeks or vehicle. C) CCL11 (eotaxin-1) concentrations were determined in rats exposed to ethanol (3 g/kg, i.g.) during 4 weeks or vehicle with/without acute stress before ethanol exposure. Bars are means and SEM (ng/mL). CXCL12 and CX₃CL1 concentrations were analyzed by Student's t-test and () p<0.01 denotes significant differences compared to the vehicle group. CCL11 concentrations were analyzed by ANOVA and (***) p<0.001 and (&&) p<0.01 denote significant main effect of ethanol and stress, respectively.**

Figure 1

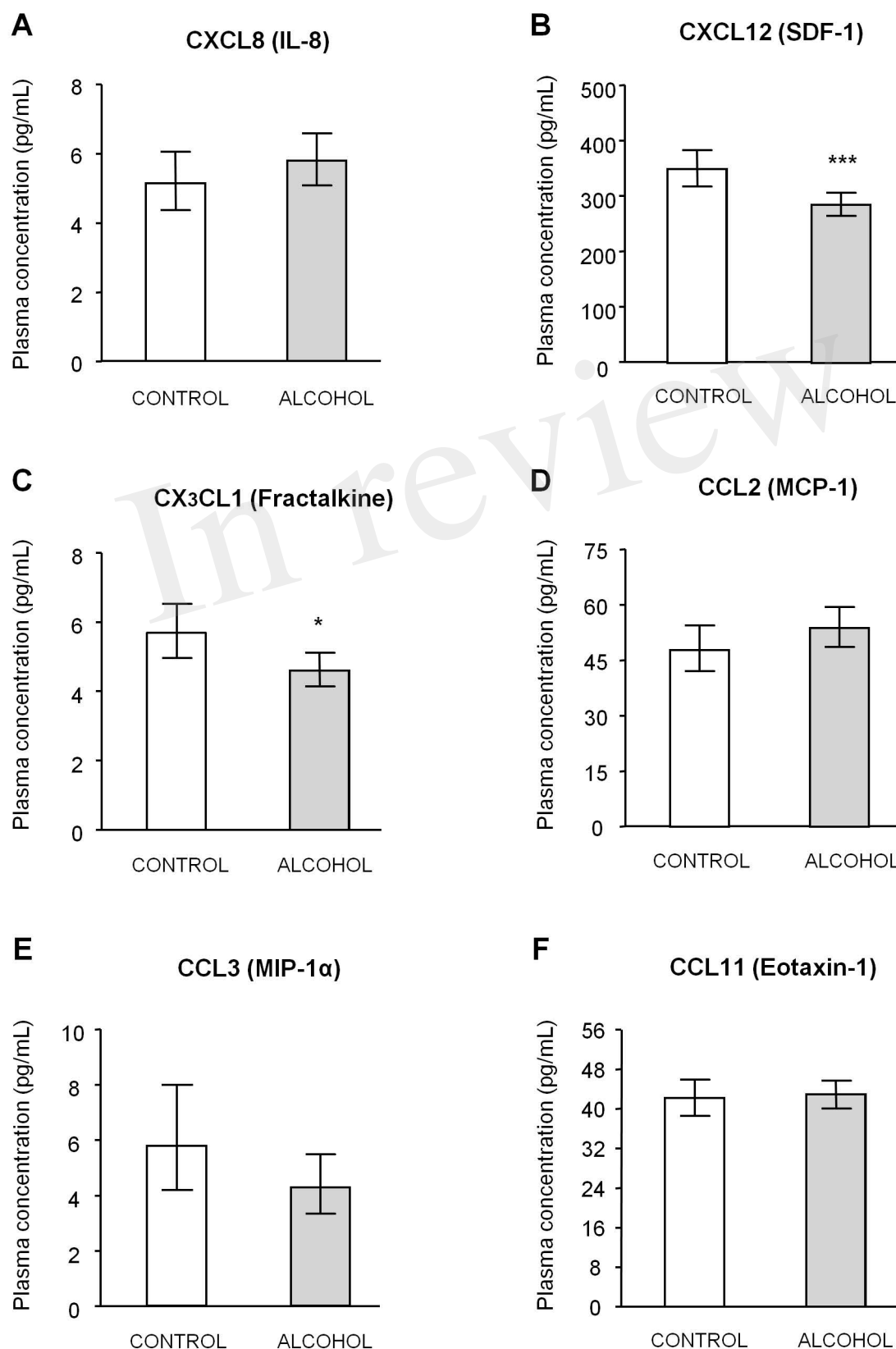


Figure 2

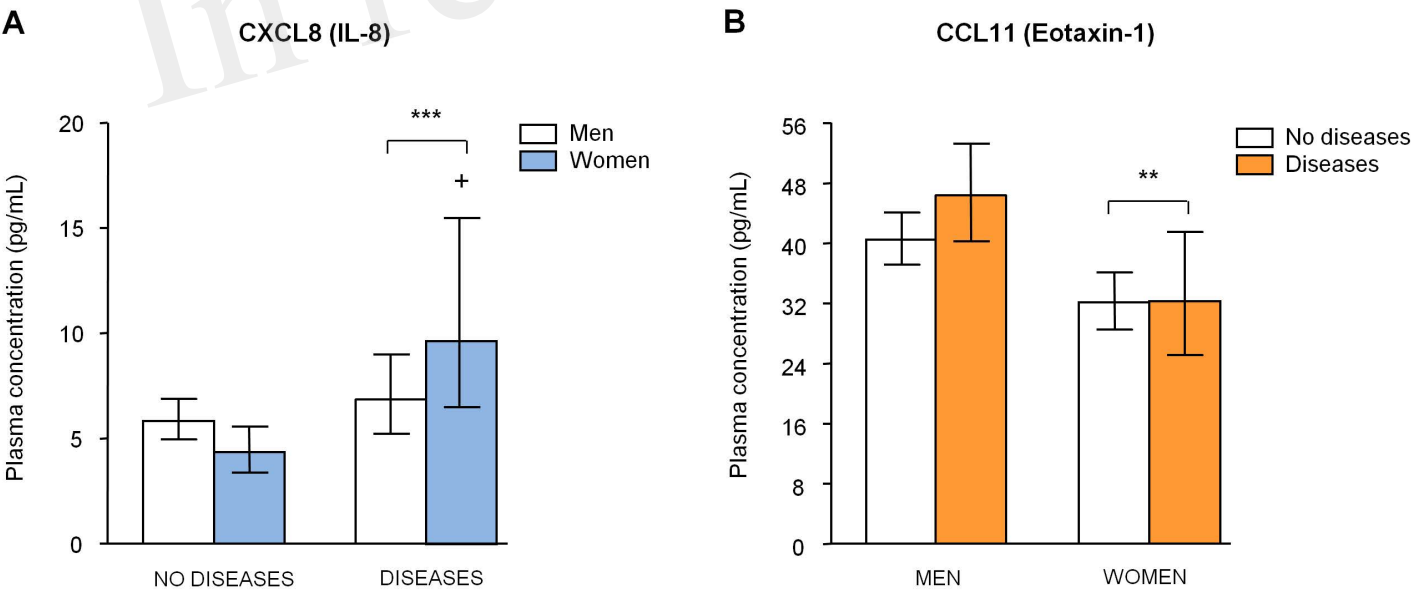


Figure 3

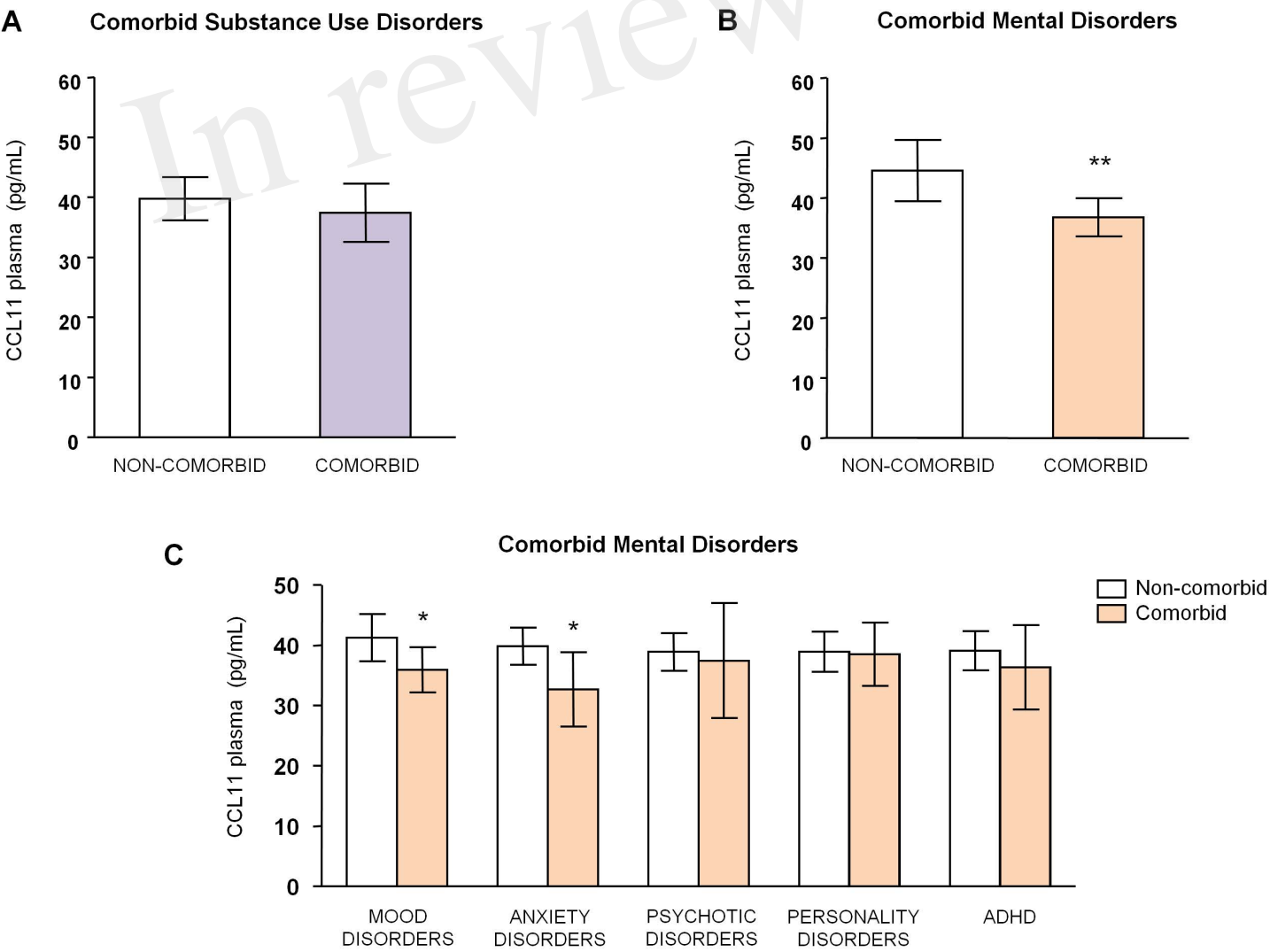
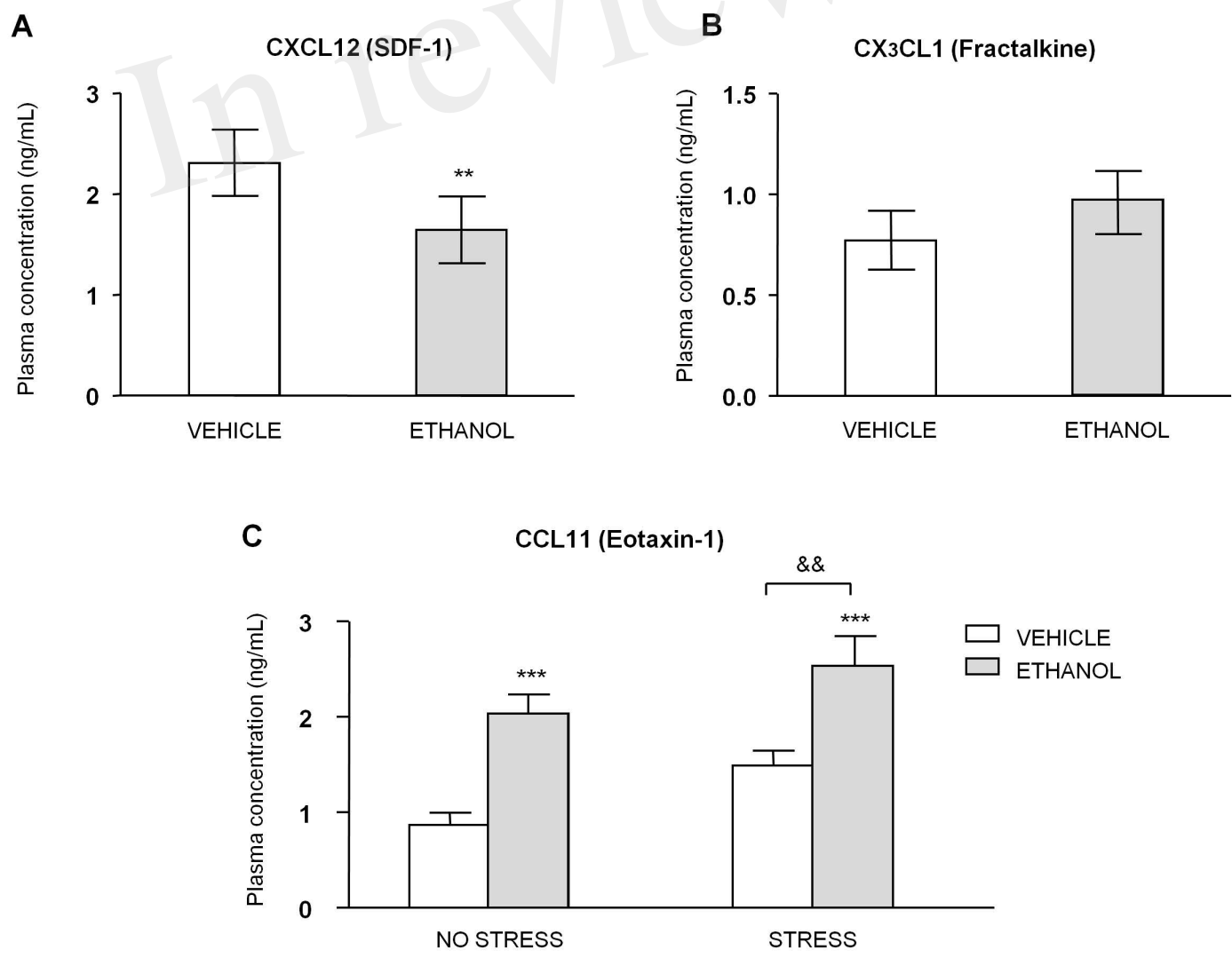


Figure 4



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1

Plasma concentrations of CCL3 (MIP-1 α) and CCL11 (eotaxin-1) in abstinent AUD patients and control subjects according to sex. A) CCL3 (MIP-1 α); and B) CCL11 (eotaxin-1). Bars are marginal means and 95% CI (pg/mL). Data were analyzed by two-way ANCOVA. (*) $p < 0.05$ denotes a significant main effect of sex. (+++) $p < 0.001$ denotes interaction and significant differences compared to male alcohol subgroup interaction of history of AUD and sex.

Figure S2

Plasma concentrations of CCL11 (eotaxin-1) in abstinent AUD patients according to psychiatric comorbidity and sex. A) CCL11 (eotaxin-1) according to comorbid substance use disorders; and B) CCL11 (eotaxin-1) according to comorbid mental disorders. Bars are estimated marginal means and 95% CI (pg/mL). Data were analyzed by two-way ANCOVA. (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.001$ denote significant main effect of sex.

Figure S1

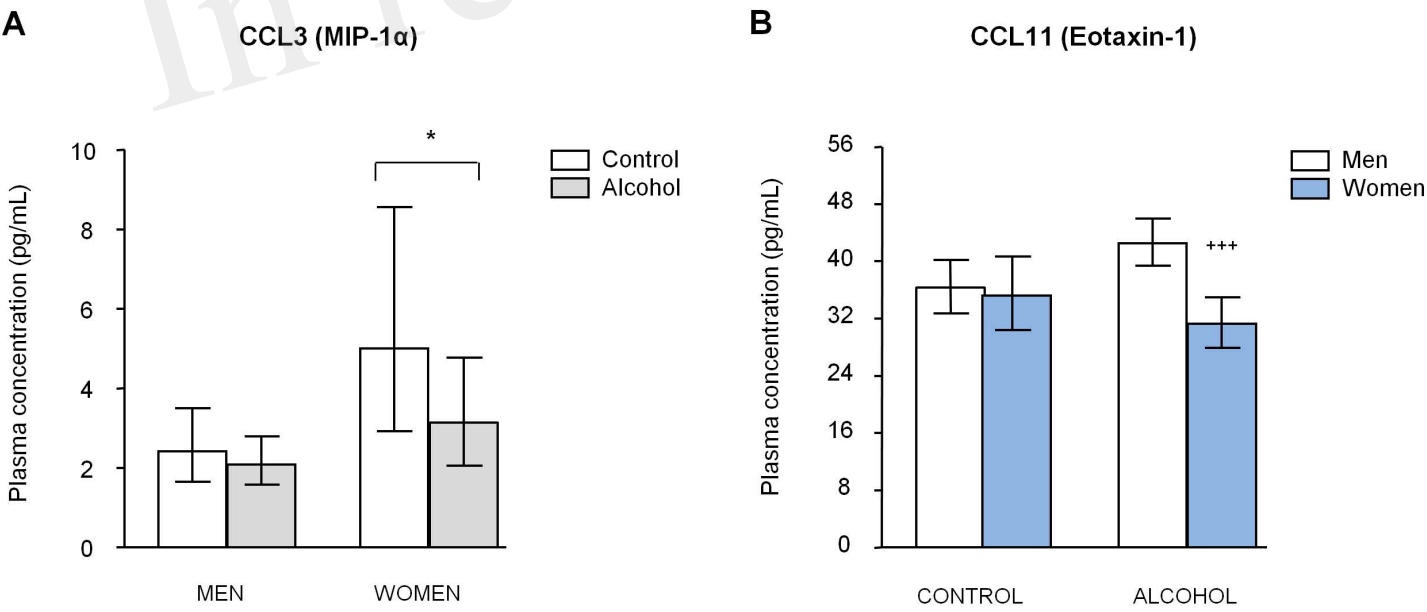


Figure S2

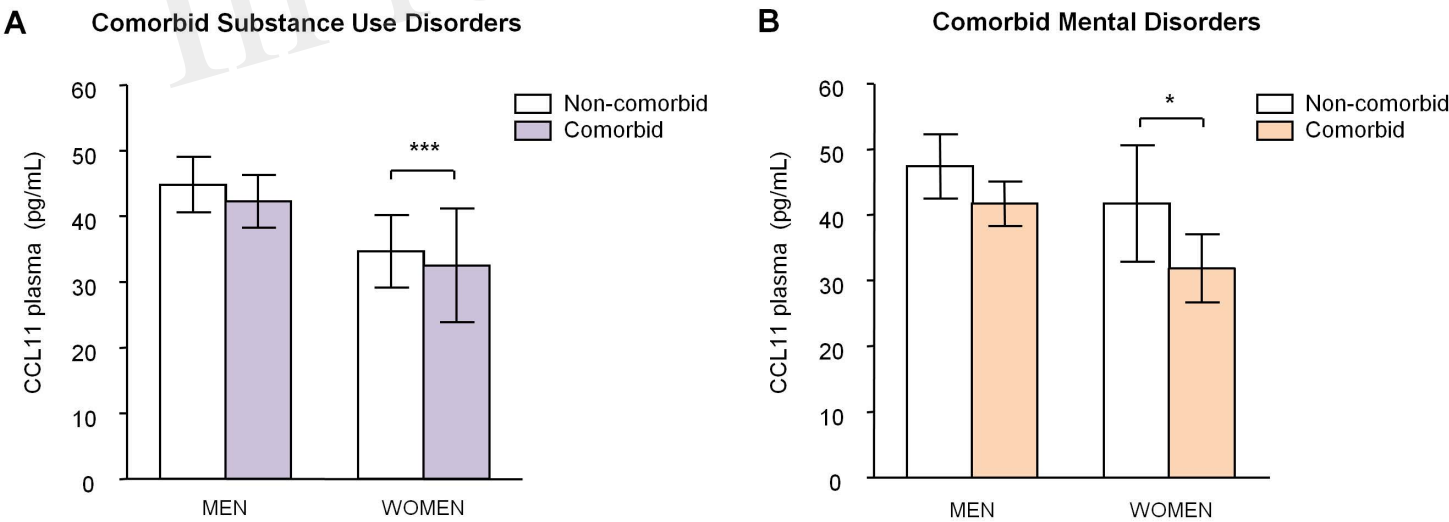


Figure 1

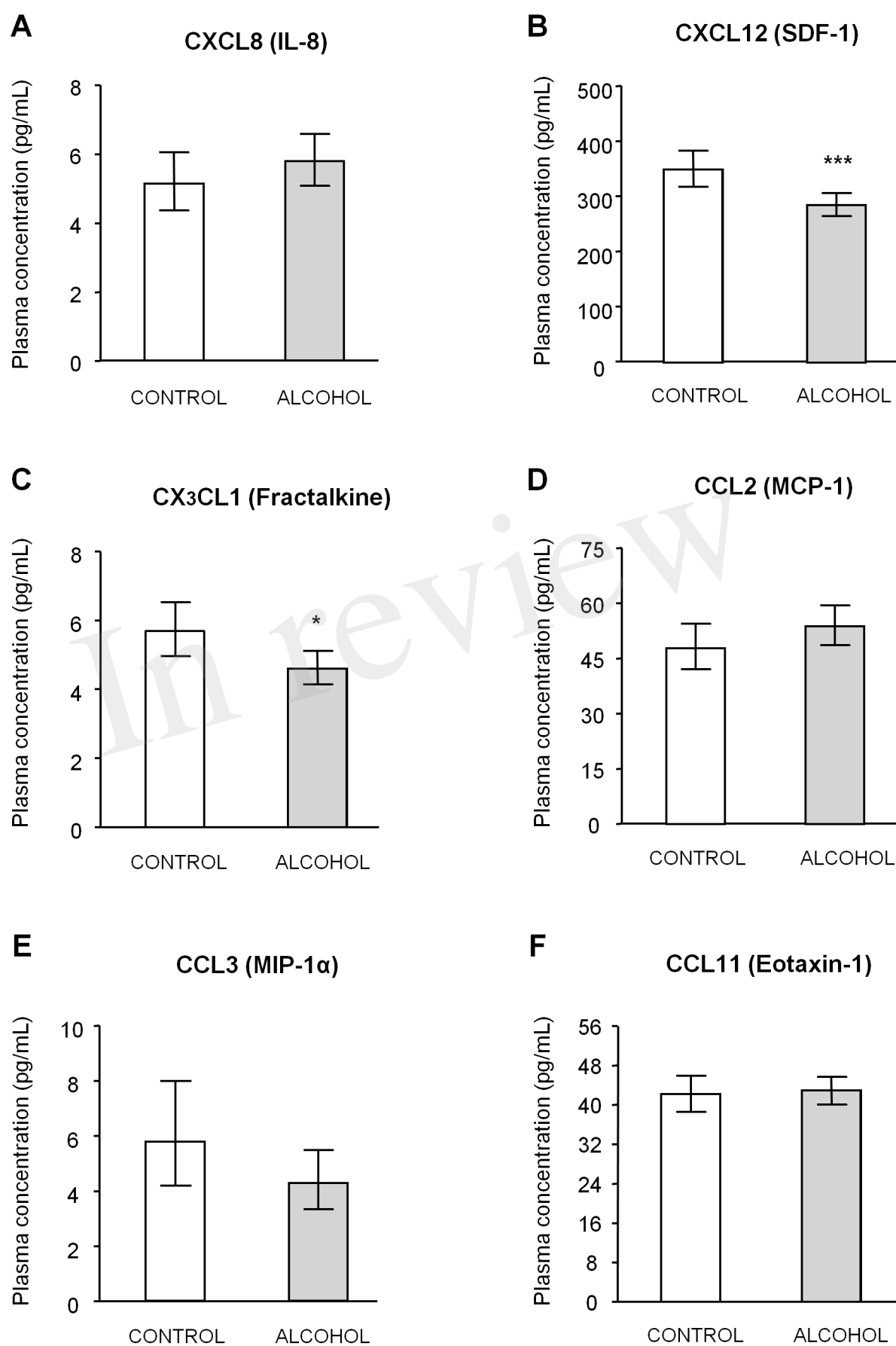


Figure 2

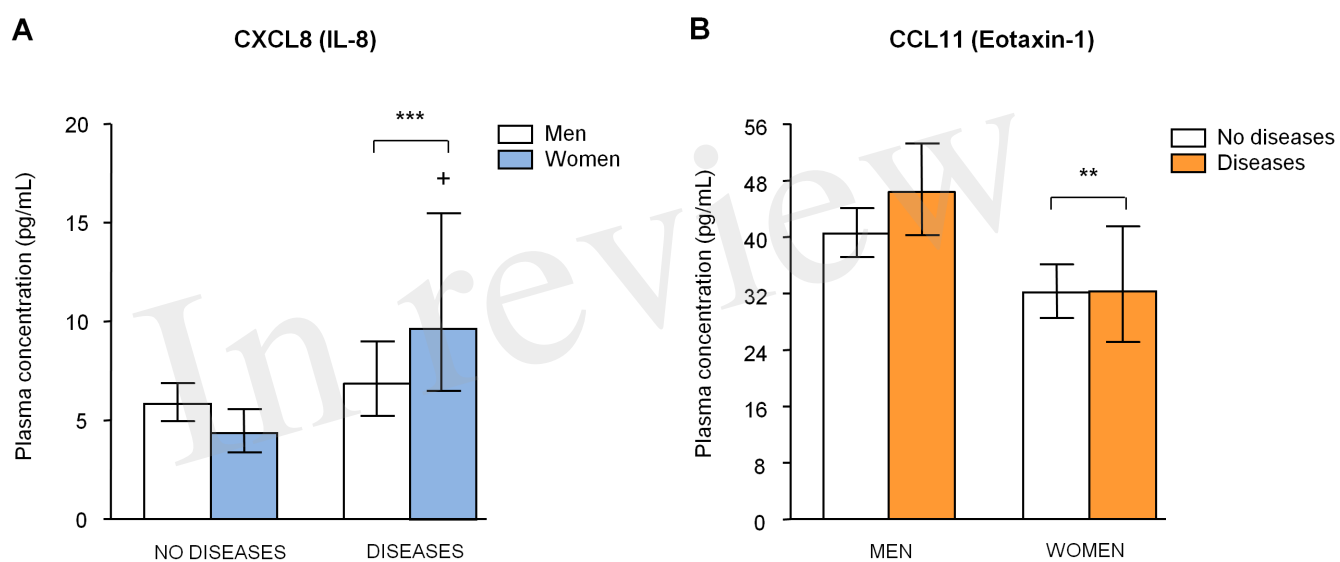


Figure 3

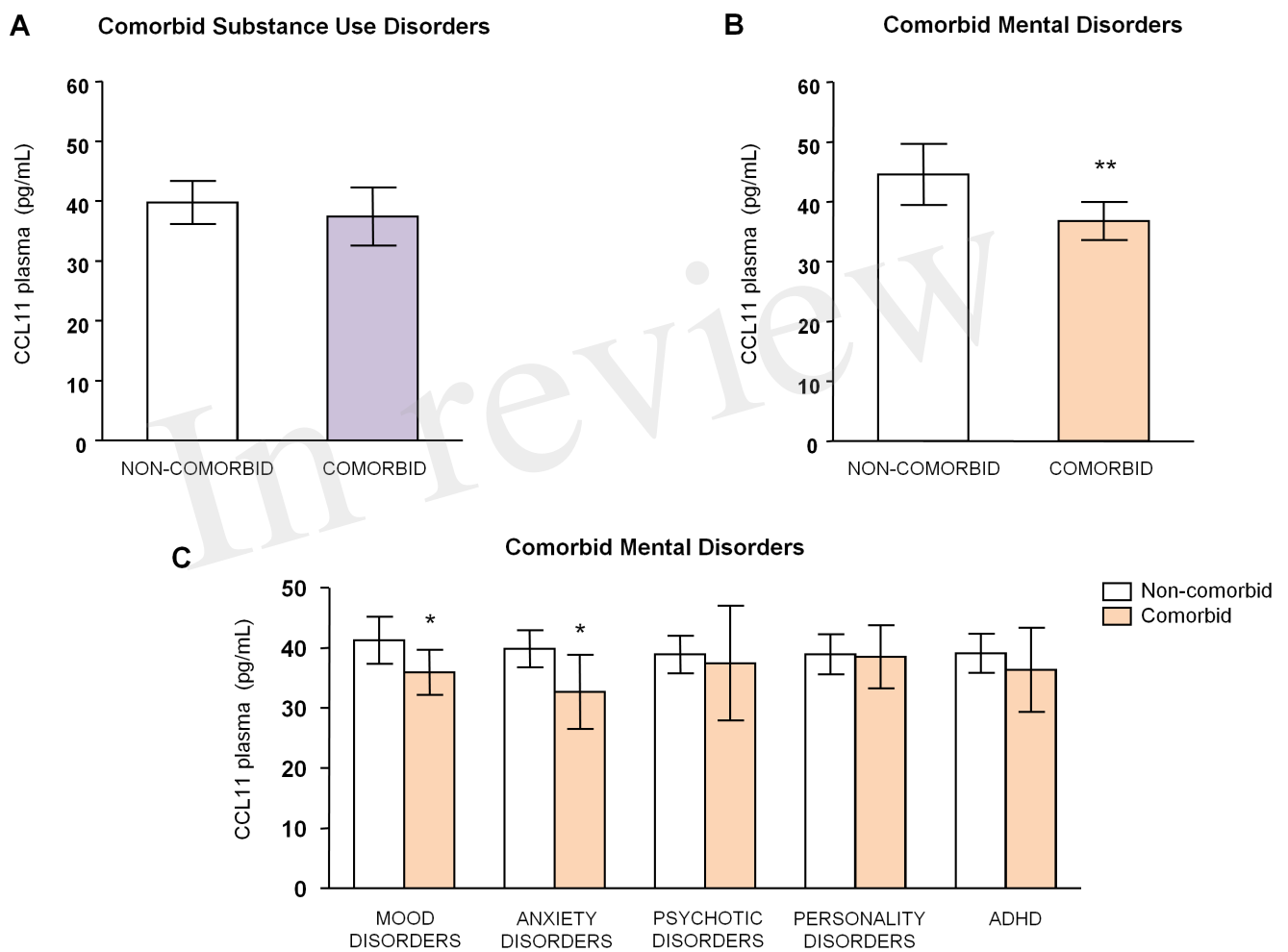
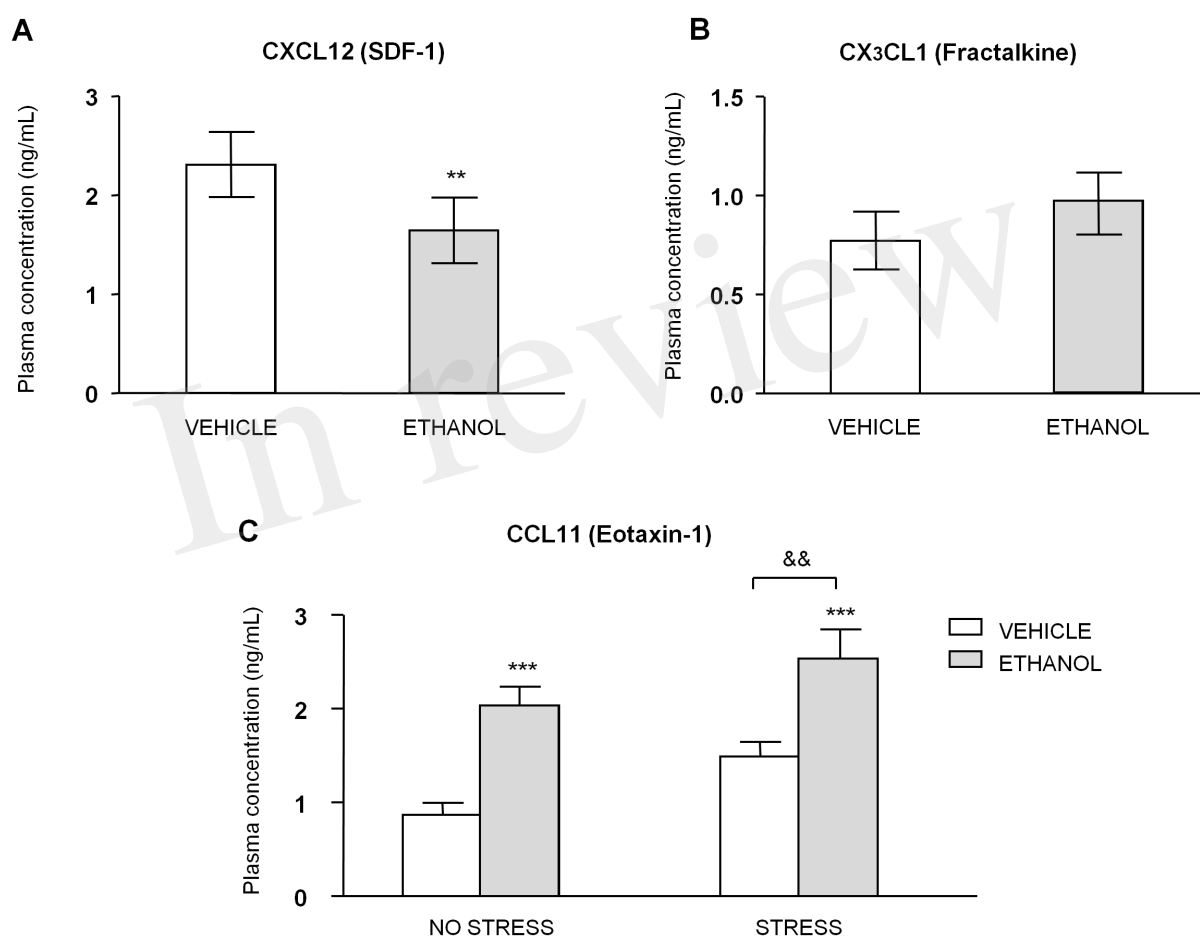


Figure 4



5. Discusión

El propósito común de los tres estudios que componen este trabajo es la identificación de alteraciones en algunos sistemas de mediadores biológicos presentes en el plasma de pacientes diagnosticados de trastornos por uso de alcohol y que puedan presentar comorbilidad psiquiátrica asociada. La necesidad de buscar una prueba biológica objetiva que ayude a estratificar a estos pacientes nace de la dificultad observada para el correcto abordaje terapéutico de estos pacientes. Para ello, en esta discusión se van a integrar los resultados obtenidos en cada uno de los tres estudios, considerándolos como partes interrelacionadas de un análisis continuo en modelos humanos, que avanza en base a evidencias obtenidas en modelos animales tanto en alcohol como en otras sustancias adictivas, como es la cocaína.

Los hallazgos más relevantes que hemos obtenido se resumen en:

- I. Existe una elevada comorbilidad psiquiátrica en pacientes que solicitan tratamiento ambulatorio debido a trastornos por uso de alcohol, a la vez que se diferencian distintos patrones de consumo entre hombres y mujeres con prevalencias distintas en los trastornos psiquiátricos comórbidos.
- II. Se encuentran alteraciones en las concentraciones plasmáticas de monoacilgliceroles en pacientes con trastornos por uso de alcohol. Es posible que exista una relación entre los diagnósticos de trastornos de ansiedad y los niveles de determinados monoacilgliceroles estudiados de manera exploratoria (2-AG y 2-OG).
- III. Aparecen alteradas también las concentraciones de determinadas aciletanolamidas con respecto al consumo de alcohol, y además se encuentra un poder predictivo en los niveles de OEA, AEA y DEA con respecto al tiempo de abstinencia de los pacientes evaluados.
- IV. Aparecen distintas alteraciones en los niveles plasmáticos de quimioquinas circulantes en una población con trastornos por uso de alcohol. Los mediadores pro-inflamatorios SDF-1 y Fractalquina tienen concentraciones menores que los controles y las concentraciones de Eotaxina-1 se ven fuertemente alteradas en el grupo de mujeres pacientes en abstinencia. Las concentraciones de IL-8 se alteran en relación a la comorbilidad médica de trastornos hepáticos, particularmente en pacientes mujeres y los niveles de Eotaxina-1 están disminuidos en relación a los diagnósticos comórbidos afectivos y de ansiedad pertenecientes al grupo diagnosticado de trastornos por uso de alcohol.
- V. Estudios en modelo animal (ratas) muestran que la exposición a etanol produce cambios en los niveles circulantes de SDF-1 similares a los observados en los pacientes con trastornos por uso de alcohol. Las ratas, que fueron sometidas a un estrés previo a la exposición a alcohol, mostraron cambios en las concentraciones de Eotaxina-1, aunque los cambios fueron opuestos a los observados en humanos en abstinencia.

Los datos obtenidos avalan la existencia de moléculas circulantes objetivas que podrían utilizarse por su diagnóstico o pronóstico como marcadores de enfermedad. El consumo de alcohol se asocia a una mayor prevalencia de consumo de otras sustancias, y su aparición junto a otros trastornos psiquiátricos dificulta el abordaje diferencial (Goldsmith, 1999) lo que conduce a una incertidumbre en la selección de tratamientos con eficacia contrastada (Karila et al., 2012). La complejidad terapéutica de las adicciones y la comorbilidad asociada a ellas, supone un gran desafío en el ámbito de la investigación y se hace necesaria la búsqueda de herramientas objetivas complementarias en los procesos de evaluación, tratamiento y prevención de conductas adictivas. La evidencia científica asienta las bases de que la exposición a sustancias de abuso como el alcohol, modifica la sintomatología comportamental, cognitiva y afectiva, además de modular la capacidad homeostática del individuo, lo que se refleja en la modificación de los niveles circulantes de moléculas bioactivas que controlan la capacidad del individuo para adaptarse al medio y luchar contra la enfermedad.

Con respecto al estudio descriptivo de una muestra de pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia, encontramos que la presencia de comorbilidad en los TUA está asociada a un mayor número de criterios de abuso y dependencia. Los trastornos más prevalentes encontrados en esta muestra son los afectivos y los de ansiedad, con una menor tasa de trastornos de la personalidad en comparación con otros trastornos derivados del consumo de otras sustancias. Existe una mayor probabilidad de padecer un trastorno afectivo a lo largo de la vida en población con trastornos por uso de alcohol (Hasin et al, 2005, 2007; Kessler et al., 1997; Ross, 1995) y además encontramos mayor presencia de este trastorno en mujeres que en hombres.

Resulta interesante destacar que en la población estudiada la probabilidad de aparición de un diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica disminuye cuando se descarta la presencia de otras sustancias de consumo. Además, la prevalencia de trastornos psiquiátricos comórbidos en población alcohol se reduce de 82,5% a 57,5% en mujeres y de 63,9% a 26,2% en hombres, cuando descartamos la presencia de criterios de abuso o dependencia a otras sustancias. El trastorno antisocial en hombres baja a 0,8%, y en mujeres el trastorno límite de personalidad disminuye hasta un 7,5%, con datos semejantes a otros estudios descritos en poblaciones de consumidores de alcohol en nuestro país (Fernández-Montalvo et al., 2006), mostrando menores tasas de comorbilidad psiquiátrica en comparación con poblaciones consumidoras de otras sustancias como los psicoestimulantes (Salom et al., 2014; Araos et al., 2015). De hecho, en un estudio reciente hemos podido comprobar que el policonsumo es la variable predictora mas importante en la gravedad y complejidad clínica de los pacientes con adicción, y la que los aleja mas de los sistemas de asistencia sanitaria públicos, relegándolos a comunidades terapéuticas o centros de internamiento de larga estancia (Araos et. al, enviado para publicación a Journal of psychoactive drugs).

Tabla 11 : Variables sociodemográficas en función del sexo de población TUA en tratamiento

PATRONES USO DE ALCOHOL	HOMBRES (N=120)		MUJERES (N=40)		VALOR P
	SIN COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA	CON COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA	SIN COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA	CON COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA	
Edad consumo alcohol [media (DE)]	17,30 (5,4)	15,92 (3,6)	16,2 (2,4)	18,2 (3,2) ^{bb}	<0,01
Edad consumo problemático alcohol [media (DE)]	29,32 (11,9)	25,73 (9,8)	34,4 (13,3)	32,5 (12,9) ^b	<0,05
Años consumo alcohol [media (DE)]	17,2 (9,1)	15,3 (6,9)	12,0 (8,2)	11,2 (6,3) ^b	<0,01
Periodos de abstinencia anteriores * [media (DE)]	1,0 (0,9)	1,3 (1,2)	1,4 (1,3)	0,9 (1,0)	0,345
Meses en abstinencia [media (DE)]	6,4 (7,2)	13,0 (20,0)	9,6 (11,7)	12,0 (19,6)	0,584
Gravedad en criterios de adicción [media (DE)]	6,4 (1,8)	8,0 (2,3) ^{aaa}	6,1 (1,1)	6,2 (1,9) ^{bbb}	<0,001

Variables diferenciales entre hombres y mujeres en patrones de uso de alcohol(^{aaa}) $p<0,001$ comparado con el grupo “Hombres sin comorbilidad”; (^{b, bb, bbb}) $p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$ comparado con el grupo “Hombres con comorbilidad”. Calculados con la prueba post-test de Dunn.

Tabla adaptada de García-Marchena et al., 2016

En el estudio de la muestra aparecen diferentes patrones de consumo de alcohol entre hombres y mujeres, como se puede ver en la Tabla 11. Las mujeres comienzan el consumo de alcohol a una edad más avanzada que los hombres, y desarrollan criterios de abuso y dependencia en un menor número de años que los hombres. El patrón diferencial de consumo en las mujeres aparece referido en otros estudios con población con trastornos por uso de alcohol (Ávila Escribano et al., 2007; Keyes et al., 2010). Además, se sabe que el dimorfismo sexual afecta a determinados marcadores biológicos. En los estudios realizados con otras sustancias como la cocaína, se ha estudiado que determinados mediadores de señalización pro-inflamatorios y algunas aciletanolamidas están alterados de forma diferente en ambos sexos en el consumo patológico de esta sustancia (Pavón et al., 2013; Araos et al., 2015), por lo tanto consideramos el factor sexo como una variable diferencial importante a tener en cuenta en el estudio de las respuestas inflamatorias en trastornos adictivos. De hecho, estudios recientes en modelos animales realizados por nuestro grupo han confirmado esta respuesta diferencial dimórfica sexualmente en los patrones de algunas citoquinas y quimioquinas circulantes (Pavón et al., 2016).

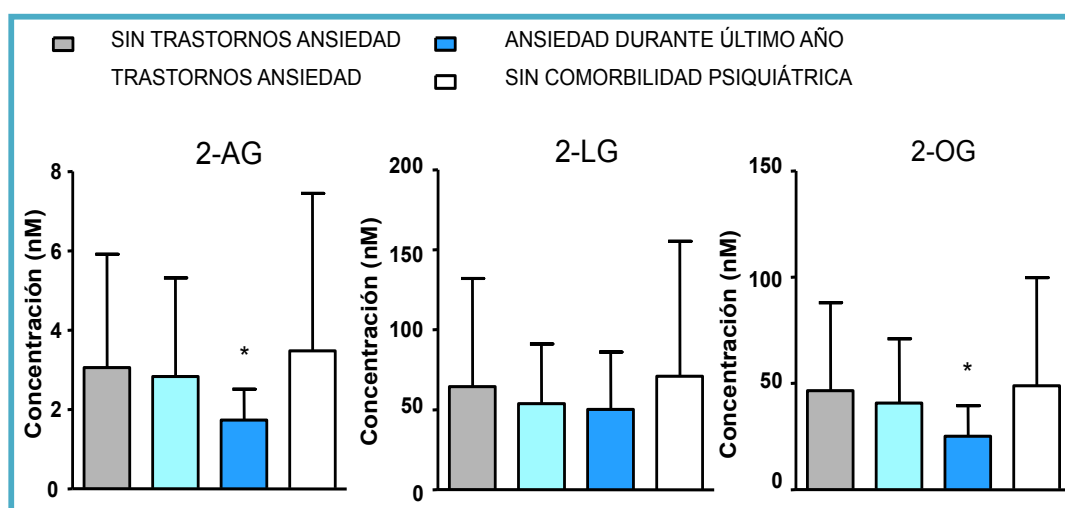
En lo que respecta a los marcadores biológicos utilizados, hemos seguido la selección de los estudios previos que hemos realizado en cocaína (Pavón et al., 2013; Araos et al., 2015), y nos hemos centrado en los sistemas endocannabinoide, de aciletanolamidas y de quimioquinas circulantes. El sistema endocannabinoide y otros lípidos bioactivos como las aciletanolamidas, son sistemas de señalización ampliamente estudiados que regulan funciones metabólicas, analgesia y respuesta a estresores. Intervienen en funciones relevantes del sistema nervioso y en el organismo en su conjunto, por estar involucradas en la adquisición y mantenimiento de conductas relacionadas con el consumo de sustancias y los procesos relacionados con la adicción (Serrano & Parsons, 2011; Bilbao et al.,

2013). La interacción de estos sistemas de señalización con otros sistemas influyen sobre la actividad neuronal cerebral e interaccionan entre sí, modificando la función del sistema inmune y nervioso autónomo. Estas modificaciones adaptativas son importantes en la comprensión de los procesos adictivos a nivel molecular (Pavón et al., 2013).

Dentro del sistema endocannabinoide se ha profundizado en el estudio de las funciones de señalización del monoacilglicerol 2-AG, el principal agonista endógeno de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. Se ha estudiado su relación con el mantenimiento de conductas adictivas (Serrano & Parsons, 2011; Bilbao et al, 2013), sobre la preferencia alcohólica y el desarrollo de tolerancia en modelos animales (Bassavarajappa et al., 2005; Caillé et al., 2007; Malinen et al., 2009; Serrano et al., 2012).

El primer estudio de la tesis muestra por primera vez la descripción de valores plasmáticos de determinados monoacilgliceroles de pacientes con trastornos por uso de alcohol en tratamiento ambulatorio (ver Figura 30). Los cambios encontrados entre la disminución de los niveles de determinados monoacilgliceroles (2-AG y 2-OG) en relación a los diagnósticos de trastornos de ansiedad con sintomatología en el último año en pacientes con TUA, resaltan la existencia de una relación entre estos sistemas de señalización y la modulación de la ansiedad ante situaciones aversivas.

Figura 30: Niveles plasmáticos de 2-acilgliceroles (2-AG, 2-LG y 2-OG) en consumidores de alcohol en abstinencia agrupados por diagnósticos de trastornos de ansiedad (DSM-IV-TR)



Niveles plasmáticos de 2-AG, 2-LG y 2-OG medidos en una muestra con TUA en abstinencia agrupados por diagnóstico de trastornos de ansiedad según DSM-IV-TR. Sin trastornos de ansiedad (N=108); Con trastornos de ansiedad (N=25); Con trastornos de ansiedad diagnosticados el último año (N=7); Sin comorbilidad psiquiátrica (N=41) (*) $p < 0.05$ muestra diferencias significativas respecto al grupo sin trastorno de ansiedad.

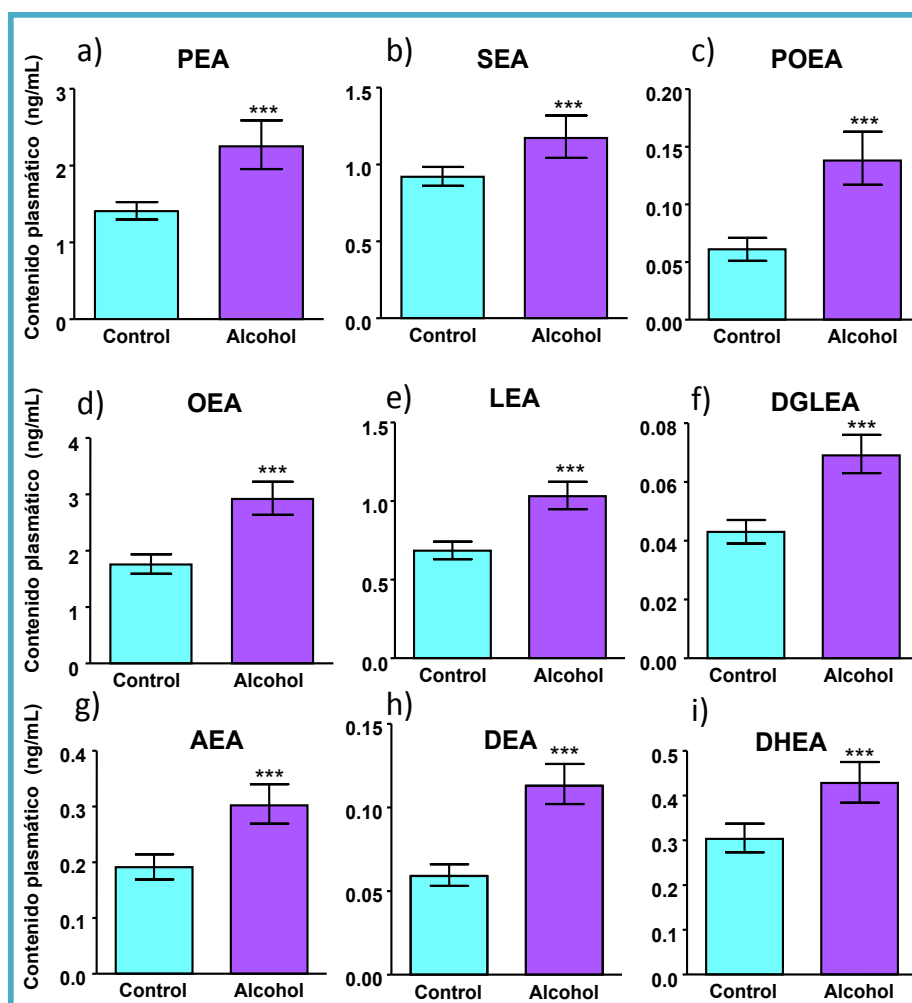
Adaptado de García-Marchena et al., 2016

Hace años que se sabe que la señalización endocannabinoide está implicada en la modulación de la ansiedad y en la respuesta emocional (Navarro et al., 1997), por lo que un incremento en la liberación de endocannabinoides se asocia a un efecto ansiolítico. Este efecto ansiolítico se puede poner de manifiesto mediante la inhibición de la degradación de endocannabinoides, lo que ha llevado al desarrollo de fármacos ansiolíticos (Gaetani et al., 2003) cuya eficacia en la ansiedad y en comportamientos asociados al abuso de alcohol y tabaco ha sido estudiada en modelos animales (Cippitelli et al., 2008, 2011). La diana de actuación sería la inhibición cannabinoide de las neuronas glutamatérgicas de la corteza prefrontal y la amígdala, ya que ha comprobado que la señalización de 2-AG en neuronas glutamatérgicas se relaciona con comportamientos de mayor ansiedad y susceptibilidad ante las crisis (Guggenhuber, 2015). Los cambios producidos por la disminución en las concentraciones de 2-AG muestran en estudios animales comportamientos de menor exploración en tareas de campo abierto, una disminución de la extinción al miedo y una reducción de la neurogénesis en el hipocampo. Esto se traduce en un aumento en los niveles de ansiedad, estrés y respuesta de miedo en los animales (Jenniches et al., 2016).

Con respecto al segundo estudio, nos centramos en el estudio de determinadas aciletanolamidas en modelos humanos con trastornos por uso de alcohol, ya que existen indicadores tanto en estudios experimentales anteriores realizados en modelos animales con alcohol (Bilbao et al., 2015), como modelos clínicos con otro tipo de sustancias de abuso como la cocaína (Araos et al., 2015; Pedraz et al., 2015) que nos sirven de antecedente en el estudio exploratorio sobre las aciletanolamidas en los TUA.

Varios estudios han demostrado que la exposición aguda a altas dosis de etanol hace disminuir las concentraciones de aciletanolamidas cannabinoides en distintas regiones cerebrales y en el tejido periférico de roedores (Ferrer et al., 2007; Rubio et al., 2007). Se ha visto que el consumo agudo de cantidades moderadas de alcohol reduce la AEA circulante en pacientes (Feuerecker et al., 2002), aunque otros estudios preclínicos han obtenido incrementos de concentraciones de AEA tras largos periodos de consumo de alcohol (Basavarajappa & Hungund, 1999; González et al., 2002; Basavarajappa et al., 2003; González et al., 2004). Con respecto a la OEA, que no es un agonista de los receptores cannabinoides y cuyas acciones se suelen oponer a las de la anandamida (Gómez et al., 2002), tanto la exposición aguda como crónica a alcohol, eleva las concentraciones circulantes de esta aciletanolamida (Bilbao et al., 2015). Estos antecedentes van en la línea de nuestros resultados en pacientes con trastorno por uso de alcohol (Estudio 2): en este estudio se ve que las concentraciones de OEA y las demás aciletanolamidas estudiadas están elevadas significativamente en pacientes con un largo historial de consumo (ver Figura 31).

Figura 31: Niveles plasmáticos de aciletanolamidas (PEA, SEA, POEA, OEA, LEA, DGLEA, AEA, DEA, DHEA) en pacientes consumidores de alcohol en abstinencia y grupo control.



Diferencias en los niveles plasmáticos de aciletanolamidas en pacientes consumidores de alcohol en abstinencia y grupo control en las siguientes aciletanolamidas: PEA (a); SEA (b); POEA (c); OEA (d); LEA (e); DGLEA (f); AEA (g); DEA (h); DHEA (i). (***) $p<0.001$ muestra diferencias significativas con el grupo control

Adaptado de García-Marchena et al., 2016

Este efecto puede deberse a que determinadas aciletanolamidas, como la OEA, sirven de señal homeostática en la regulación de la ingesta altamente calórica (Piomelli, 2003) como es el caso del alcohol. Además, se sabe que la OEA participa en los cambios producidos como huellas en el sistema de refuerzo cerebral debido a la ingesta de alimentos hipercalóricos (Téllez et al., 2013) que también se activan ante refuerzos potentes como los producidos por el consumo de sustancias.

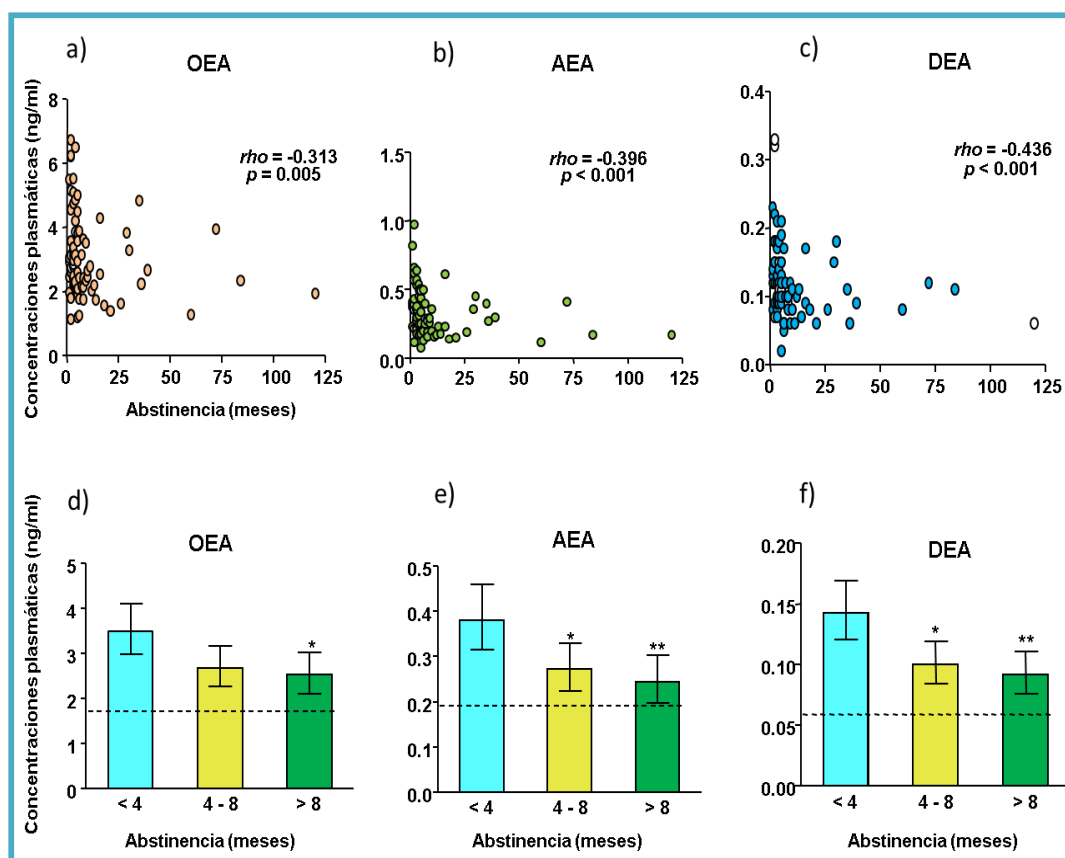
Además con respecto a estudios clínicos, nuestro estudio tienen resultados similares a los realizados con pacientes con trastornos por uso de cocaína en abstinencia (Pavón et al., 2013), y por ello para evitar la influencia del consumo de otras sustancias, se seleccionaron exclusivamente pacientes sin comorbilidad en TUS que pudieran afectar a los resultados obtenidos. Este hecho abre la posibilidad interesante de que la OEA y compuestos similares sean marcadores

motivacionales, y de hecho algunos estudios en modelos animales han demostrado que las concentraciones circulantes de OEA pueden regular el sistema de recompensa, concretamente las neuronas dopaminérgicas, en relación con el valor hedónico de la comida hipercalórica (Téllez et al., 2013). Apoyando este hecho, un estudio reciente de nuestro laboratorio demostró que la OEA es capaz de regular la ingesta, autoadministración y recaída al alcohol en modelos animales (Bilbao et al., 2016).

El hecho de que las aciletanolamidas se alteren ante los TUA, sugiere que el origen de estas alteraciones puede depender de distintos factores neuroadaptativos, así como de cambios en las vías de síntesis y degradación de las aciletanolamidas. Aunque son numerosos los estudios que muestran que las alteraciones genéticas en la expresión o función de FAAH confieren una susceptibilidad hacia la adicción al alcohol (Serrano & Parsons, 2011), no se han observado cambios en la actividad de FAAH asociada a la alteración de aciletanolamidas tras la exposición al etanol (Ferrer et al., 2007; Rubio et al., 2009). Los cambios observados en el plasma de los pacientes en abstinencia pueden deberse a la activación del sistema simpático debido a la exposición al alcohol (Spanagel, 2009) y estudios previos han descrito un aumento de la movilización de OEA en los tejidos periféricos tras la activación del sistema nervioso simpático (Guzman et al., 2004; LoVerme et al., 2006; Fu et al., 2011).

Con nuestros resultados se demuestra una relación entre las concentraciones plasmáticas de OEA y la duración de los tiempos de abstinencia de cada paciente. Cuando comparamos grupos de pacientes clasificados por distintos periodos de abstinencia, encontramos que las concentraciones de OEA están incrementadas en los primeros meses de la abstinencia con respecto al grupo control (ver Figura 32). Las concentraciones de OEA se reducen de forma gradual, a medida que aumenta el tiempo de abstinencia de los pacientes, hasta aproximarse a las concentraciones observadas en el grupo control. Además, los estudios en ratas refieren un aumento constante de las concentraciones plasmáticas de OEA en el consumo crónico de alcohol, que comienzan a disminuir tras la retirada del alcohol a los animales (Ferrer et al., 2007; Bilbao et al., 2015). Mientras las concentraciones de otras aciletanolamidas están alteradas en los pacientes abstinentes, solo AEA y DEA muestran un comportamiento similar a la OEA, esto es, dependiente de la duración de la abstinencia al alcohol. Las aciletanolamidas son las moléculas que mejor distinguen a los sujetos con TUA abstinentes de los sujetos control. Que el tiempo de abstinencia al alcohol pueda producir modificaciones en las concentraciones de determinadas aciletanolamidas, convierte a estas moléculas en potenciales biomarcadores de consumo y de abstinencia en los trastornos por uso de alcohol.

Figura 32: Niveles plasmáticos de OEA, AEA y DEA en relación al tiempo de abstinencia de alcohol.



Análisis de correlación entre la duración de la abstinencia (meses) y las concentraciones plasmáticas de OEA (a), AEA (b) y DEA (c). Se indican los coeficientes de correlación de Spearman (ρ). Las concentraciones plasmáticas de OEA (d), AEA (e) y DEA (f) en pacientes con TUA divididos en tres subgrupos acorde a la duración de la abstinencia de alcohol. Las medias tienen correlación logarítmica e IC de 95%. %.(*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ muestran diferencias significativas comparado con el grupo <4. La línea de puntos representa las concentraciones medias del grupo control. Adaptado de García-Marchena et al. 2016

No se observan cambios en las concentraciones de las aciletanolamidas asociadas a la gravedad de la adicción al alcohol (medida con el sumatorio de los criterios de abuso y dependencia DSM-IV-TR) y tampoco se encontraron diferencias entre estas concentraciones y los diagnósticos de comorbilidad psiquiátrica con otros trastornos del eje I ni del eje II. No hemos encontrado diferencias entre los pacientes en abstinencia con trastornos hepáticos inducidos por el alcohol. Por lo tanto, se descarta en este estudio la influencia del daño hepático en las concentraciones de estas aciletanolamidas.

Además, en este estudio exploratorio se encuentran diferencias debidas a dimorfismo sexual en las concentraciones de POEA, con distintas concentraciones en mujeres que en hombres, de forma similar a lo que ocurría en el estudio de trastornos por uso de cocaína (Pedraz et al., 2015). Aunque es necesaria una investigación más profunda sobre las diferencias sexuales que se reflejan en estos biomarcadores, la idea de que se puedan encontrar marcadores dimorficos

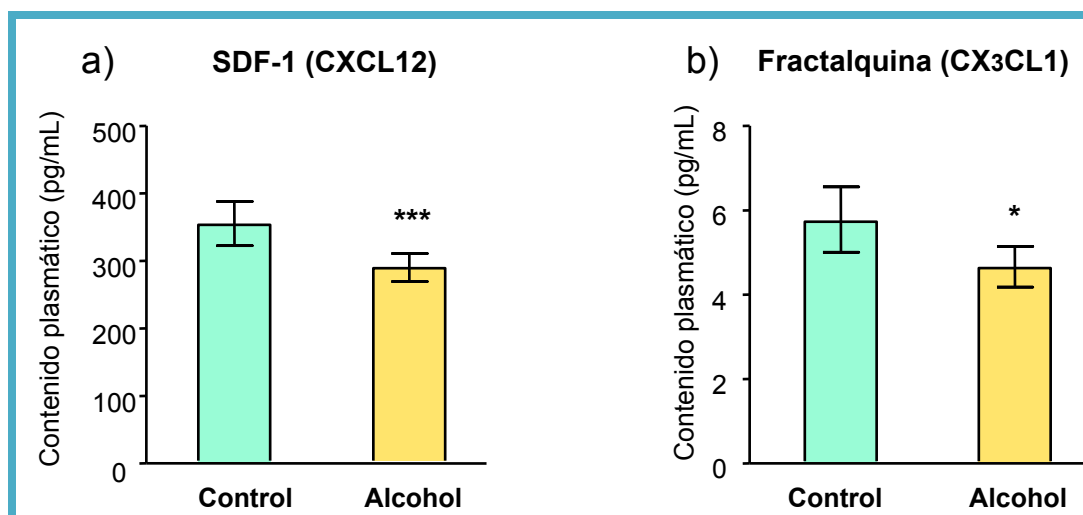
sexuales es de gran interés clínico dado el patrón y sintomatología clínica diferencial existente entre ambos sexos en relación con la presentación y curso de los TUA.

Por lo tanto, este segundo estudio apoya la idea de que la OEA, así como otras aciletanolamidas insaturadas como la AEA y DEA, están asociadas con la historia del consumo de alcohol y el tiempo de abstinencia a la sustancia, por lo que su monitorización tendrían grandes ventajas terapéuticas para los pacientes con este tipo de trastornos adictivos, al igual que lo que hemos podido ver en el primer estudio con monoacilglicerolos.

En el tercer estudio de la presente tesis se parte de la idea de que la neuroinflamación tiene mecanismos en común con el desarrollo de distintas enfermedades, entre las que se encuentran los trastornos adictivos (Stuart & Baune, 2014) y además se sabe que el alcohol es una sustancia que puede activar directamente procesos autoinmunes (Pascual et al., 2015). Para ello monitorizamos determinados mediadores pro-inflamatorios en los trastornos por uso de alcohol y relacionamos sus alteraciones con el consumo, con el tiempo de abstinencia a la sustancia y con la presencia de diagnósticos de trastornos comórbidos, tanto médicos como psiquiátricos.

Los mediadores inflamatorios seleccionados fueron quimioquinas, por varias razones. En primer lugar porque están menos estudiados en relación con la adicción a drogas que otros compuestos de la superfamilia de las citoquinas. En segundo lugar porque muchas de ellas se expresan en la microglia, la célula inmune residente en el cerebro que participa de procesos básicos como la remodelación sináptica y el podado sináptico en momentos críticos del desarrollo (Paolicelli et al., 2011 & 2014). En tercer lugar por estudios previos realizados en nuestro laboratorio en pacientes con trastorno por uso de cocaína. En nuestros resultados se vio que los pacientes con un historial de trastornos por uso de alcohol presentaron menores concentraciones de SDF-1 y Fractalquina en comparación con el grupo control como se puede ver en la Figura 33. Otros estudios habían mostrado con anterioridad una asociación entre niveles de quimioquinas y sustancias de abuso, en concreto con la cocaína (Araos et al., 2015). Con respecto a esta sustancia, se había analizado un decremento en las concentraciones plasmáticas de SDF-1 y una correlación positiva entre los niveles de Fractalquina y los criterios de gravedad de adicción a cocaína en pacientes abstinentes en tratamiento ambulatorio (Araos et al., 2015; Pedraz et al., 2015). Además, se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas en ambas quimioquinas en ratas expuestas a cocaína (Pedraz et al., 2015). En otros estudios realizados en consumidores crónicos de cocaína, se mostraba un aumento en los niveles de SDF-1 al comienzo de tratamiento, que disminuía tras una abstinencia mantenida de un mes (Sáez et al., 2011).

Figura 33: Niveles plasmáticos de SDF-1 y Fractalquina en relación al consumo de alcohol



Análisis de covarianza ANCOVA de dos vías con el "historial de consumo de alcohol" y "sexo" como factores, "edad" e "IMC" como covariables en las concentraciones plasmáticas de SDF-1 (a) y en Fractalquina (b). *Observamos un efecto del factor consumo en SDF-1 ($F_{(1,129)}=11,589$, $p<0,001$); *** Observamos un efecto del factor consumo en Fractalquina ($F_{(1,129)}=6,124$, $p=0,015$).

Adaptación de García-Marchena et al., 2016

Al contrario de lo que ocurre en cocaína, existen menos datos sobre los cambios en niveles circulantes de SDF-1 en modelos de exposición a alcohol. Algunos estudios en humanos (Chiva-Blanch et al., 2014) y en ratones (Gil-Bernabé, 2011) observan elevadas concentraciones en esta quimioquina tras un consumo moderado. Por el contrario, encontramos menores concentraciones de SDF-1 en pacientes con TUA y también en ratas expuestas al consumo de alcohol tras una semana de abstinencia. Con respecto a la Fractalquina, casi todos los estudios sobre esta quimioquina están centrados en medidas obtenidas en SNC (Gofman et al., 2014; Sokolowski et al., 2014) y en el páncreas (Uchida et al., 2013; Yasuda et al., 2008; Uchida et al., 2013) aunque un estudio reciente ha referido concentraciones elevadas de Fractalquina en el suero de ratones tras 5 meses de exposición crónica con etanol (Pascual et al., 2015), con resultados opuestos a nuestros datos clínicos en alcohol. Es importante indicar que la especie, las dosis y la intensidad de la exposición no son comparables entre estos dos experimentos y sería necesario un estudio más profundo para comprender el curso de los cambios que se producen en los niveles plasmáticos tras la exposición tanto aguda como crónica al alcohol.

Aunque el aumento de los niveles circulantes de SDF-1 y Fractalquina tras la exposición a alcohol parezca un resultado opuesto a nuestros resultados, existen diferencias importantes entre ambos estudios clínicos, como el tiempo de abstinencia transcurrido y la gravedad de la adicción. Nuestro estudio se realizó en pacientes diagnosticados con un trastorno por uso de alcohol con una abstinencia prolongada (9 meses de media) y con un historial de consumo elevado, mientras que los otros estudios citados en humanos se realizaron con pacientes con riesgo cardiovascular debido a un consumo moderado de alcohol. Esta discrepancia nos indica que la fluctuación en los niveles de quimioquinas puede variar dependiendo de la duración de la abstinencia, así como de la intensidad del trastorno.

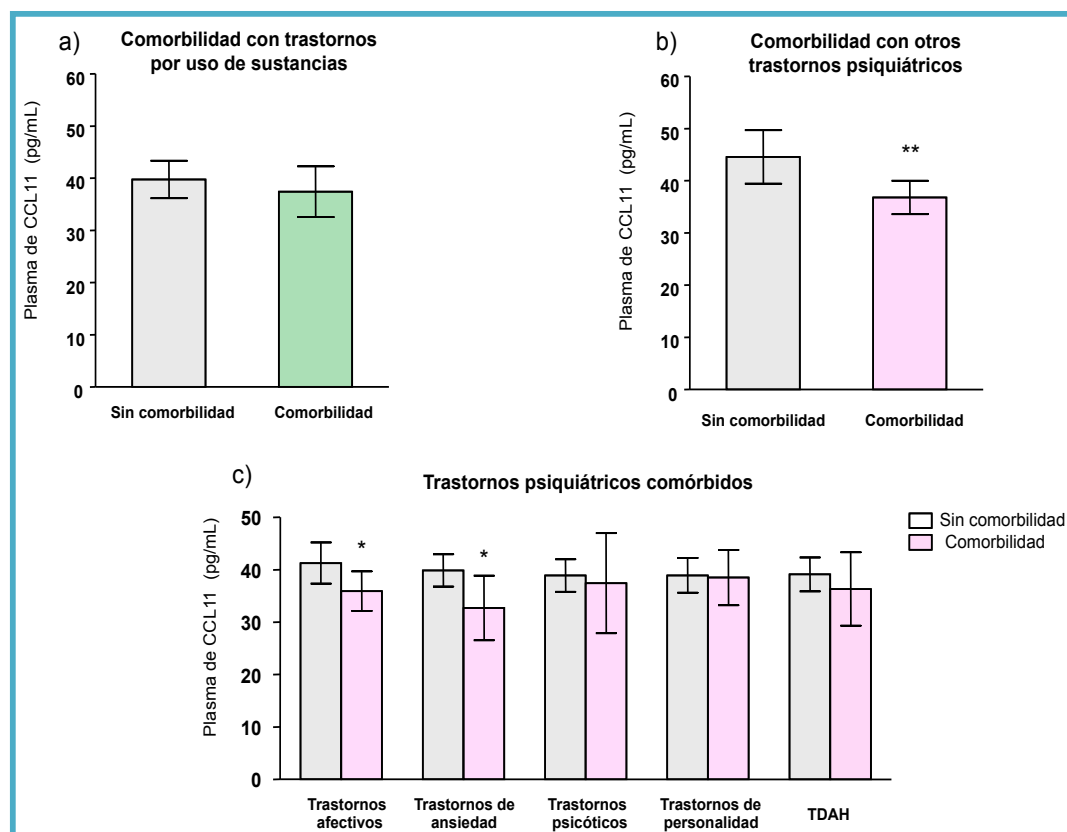
Se ha evaluado también la influencia de las variables relacionadas con el patrón de consumo de alcohol como la gravedad, medida por la suma de criterios de abuso y dependencia, el tiempo de abstinencia de los pacientes y el diagnóstico de trastornos digestivos inducidos por esta sustancia. En estudios previos se ha visto una asociación entre los niveles de SDF-1 y Fractalquina con los criterios de gravedad en pacientes con trastornos por uso de cocaína en abstinencia (Araos et al., 2015), pero ninguna de estas quimioquinas se había visto relacionada con la gravedad de los trastornos por uso de alcohol. De hecho, encontramos las concentraciones de SDF-1 y CX₃CL1 disminuidas en el grupo alcohol pero ninguna de ellas, con efecto significativo. La prevalencia de cirrosis, hepatitis o pancreatitis es del 24% en nuestra muestra y la presencia de trastornos digestivos inducidos por alcohol, altera la expresión de los niveles de IL-8. Los estudios clínicos y preclínicos han mostrado que el aumento de las concentraciones en IL-8 está relacionado con la patogénesis de los trastornos hepáticos y pancreáticos inducidos por alcohol (Szuster-Ciesielska et al., 2000; Swiatkowska-Stodulska et al., 2006). Este estudio confirma el papel de IL-8 como un potencial indicador de trastornos hepáticos y pancreáticos.

Además de los marcadores pro-inflamatorios que sabíamos que se alteraban en presencia de sustancias como la cocaína, en el presente estudio se añadió el análisis de la quimioquina Eotaxina-1 en los trastornos por uso de alcohol, por su implicación en los procesos de neuroinflamación y algunos trastornos psiquiátricos (Teixeira et al., 2008; Barbosa et al., 2013; Panizzutti et al., 2015; Grassi-Oliveira et al., 2012). La mayoría de estudios en Eotaxina-1 están asociados con procesos alérgicos y problemas asmáticos, ya que esta quimioquina se ha identificado como un potencial biomarcador para el diagnóstico y evaluación de la severidad del asma (Wu et al., 2014) pero no existen datos sobre el papel de la Eotaxina-1 en trastornos por uso de sustancias. En nuestro estudio exploratorio, se estudia el efecto potencial de la presencia de comorbilidad psiquiátrica sobre las concentraciones de quimioquinas a causa de la alta tasa de prevalencia en la muestra estudiada, como se muestra en la Figura 34. Aunque no encontramos relación con trastornos comórbidos por uso de otras sustancias (Figura 34a), sí los encontramos en otros trastornos mentales comórbidos (Figura 34b). Los pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia muestran una elevada comorbilidad psiquiátrica y el 40% cumplían criterios de abuso y/o dependencia de otras sustancias.

Las diferencias entre las concentraciones de Eotaxina-1 encontradas entre los hombres y mujeres del grupo de pacientes en abstinencia, indican la presencia de un dimorfismo sexual en las concentraciones de Eotaxina-1 en respuesta al trastorno por uso de alcohol, como aparece reflejado en la Figura 35. La edad y el sexo son variables críticas en la expresión de señales inflamatorias (Czlonkowska et al., 2006; Harry, 2013; Larsson et al., 2015) y debido a esta razón, se incluyeron como variables independientes en los análisis estadísticos. CCL3 y especialmente CL11 están afectados por estas variables fisiológicas. Es la primera vez que se muestran diferencias debidas al sexo en los niveles de CCL3, pero existen varios estudios que han descrito anteriormente la asociación de Eotaxina con la edad y el sexo (Targowski et al., 2005; Shurin et al., 2007). Por ejemplo, Targowski y su equipo refieren que en una población de sujetos sanos, la muestra más joven (de

25 a 34 años) tiene menores niveles de Eotaxina-1 que los participantes mayores (de 35 a 55 años). Además, se muestran concentraciones disminuidas de Eotaxina-1 en mujeres (Tagowski et al., 2005). Otro estudio, también realizado en población sin trastornos por uso de alcohol (de 40 a 80 años), refieren que las concentraciones de Eotaxina-1 aumentan de forma gradual debido a la variable edad, sin afectación del sexo, sugiriendo que las diferencias sexuales podrían desaparecer a medida que avanza la edad (Shurin et al., 2007).

Figura 34: Niveles plasmáticos de Eotaxina-1 en relación a la comorbilidad psiquiátrica con trastornos por uso de sustancias y otros trastornos psiquiátricos



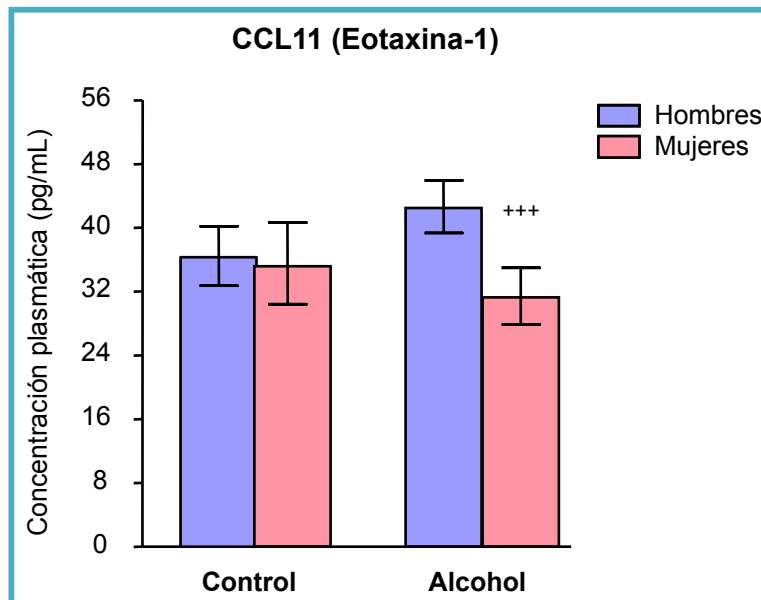
Análisis de covarianza ANCOVA de dos vías con el “trastornos por uso de sustancias comórbidos” o “otros trastornos mentales comórbidos” y “sexo” como factores, “edad” y “medicación psiquiátrica” como covariables en las concentraciones plasmáticas. No se encuentran efectos sobre trastornos por uso de sustancias en las concentraciones de Eotaxina-1 (CCL11) (a); Se encuentra un efecto significativo en las concentraciones de Eotaxina-1 con respecto a los diagnósticos de trastornos mentales comórbidos (b); encontramos concentraciones de Eotaxina-1 afectadas significativamente en trastornos afectivos ($F_{(1,79)}=4,627$, $p=0,034$) y trastornos de ansiedad ($F_{(1,79)}=4,942$, $p=0,028$) (c).

Adaptación de García-Marchena et al., 2016

Nuestro estudio va en la línea de los resultados descritos, ya que existe un efecto significativo de la edad en Eotaxina-1 resultado de una correlación positiva, particularmente en el grupo control. No se observaron diferencias en las concentraciones entre mujeres y hombres en el grupo control, pero se encontró una clara disminución en la expresión de Eotaxina-1 en el grupo de mujeres con diagnóstico de TUA en abstinencia, con respecto a los hombres.

Debido a esto, es posible que los TUA puedan inducir en los niveles de Eotaxina-1 interfiriendo en los efectos esperados de la edad y enfatizando las diferencias sexuales.

Figura 35: Niveles plasmáticos de Eotaxina-1 con respecto al consumo de alcohol entre hombres y mujeres



Análisis de covarianza ANCOVA de dos vías con el “historial de consumo de alcohol” y “sexo” como factores, “edad” y “IMC” como covariables. +++(p<0,001) muestras diferencias significativas en el grupo alcohol en mujeres.

Adaptación de García-Marchena et al., 2016

Mientras que un uso patológico de alcohol y de otras sustancias de abuso no tiene efecto sobre los niveles de quimioquinas evaluadas, el diagnóstico de otros trastornos comórbidos tiene un efecto primario en la expresión de Eotaxina-1. Numerosos estudios han demostrado una asociación entre niveles Eotaxina-1 y algunos trastornos mentales, como la esquizofrenia (Teixeira et al., 2008), trastornos afectivos de tipo bipolar (Barbosa et al., 2013; Panizzutti et al., 2015), depresión mayor (Grassi-Oliveira et al., 2012) y trastornos con ideación suicida (Grassi-Oliveira et al., 2012) pero no hay estudios realizados en el contexto de los TUS. Nuestros datos revelan una expresión disminuida de las concentraciones de Eotaxina-1 en pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia con diagnósticos de comorbilidad psiquiátrica, y este decremento se observa más claramente en mujeres. Tras la evaluación de los trastornos psiquiátricos por separado, los trastornos afectivos y de ansiedad confirman su asociación con Eotaxina-1, mostrando menores concentraciones en pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia. La evidencia muestra una fuerte asociación entre las altas concentraciones de Eotaxina-1 y una disminución de la neurogénesis y alteraciones cognitivas (Villeda et al., 2011), y este hecho se observa en sujetos con edades avanzadas. De acuerdo a esto, nuestro estudio describe una asociación entre las concentraciones de Eotaxina-1 y la edad, aunque las concentraciones disminuidas observadas en pacientes con TUA son resultados opuestos a los encontrados en estudios previos realizados en trastornos psiquiátricos que

reportan un aumento de las concentraciones de Eotaxina-1 en el plasma de los pacientes (Teixeira et al., 2008; Grassi-Oliveira et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Magalhaes et al., 2014; Panizzutti et al., 2015). Ninguno de los estudios anteriormente citados está realizado en el contexto de adicciones y por ello aparecen importantes diferencias con el presente estudio.

Un estudio clínico realizado en adultos jóvenes en población general no mostró efectos en las concentraciones de Eotaxina-1 como predictor de TUS, pero sin embargo sí mostró efecto ante el diagnóstico bipolar, el trastorno depresivo y el sexo (Magalhaes et al., 2014), lo que puede suponer un añadido a nuestros hallazgos en los TUA. Con respecto a la asociación entre los trastornos de ansiedad y las concentraciones de Eotaxina-1, no encontramos estudios en sujetos con adicciones y solo un estudio en sujetos con trastornos de ansiedad obsesivo-compulsivo, analizó esta quimioquina sin encontrar cambios plasmáticos significativos (Fontenelle et al., 2012). En el estudio actual encontramos diferencias importantes entre humanos y ratas. Mientras que los pacientes con diagnóstico de TUA y ansiedad comórbida muestran concentraciones bajas en Eotaxina-1, las ratas expuestas a etanol con un episodio de estrés previo por restricción del movimiento, muestran niveles plasmáticos altos de Eotaxina-1. Es importante señalar que en el momento del muestreo de pacientes, estos estaban recibiendo tratamiento. No se puede evaluar el posible impacto de las intervenciones, tanto farmacológicas como psicológicas, sobre las concentraciones plasmáticas de Eotaxina-1 debido al diseño transversal del estudio. De hecho, este impacto potencial se estudiará en futuros estudios longitudinales.

Como corolario final al análisis integrador de estos estudios podemos decir que los trastornos por uso de alcohol si pueden resultar en cambios importantes en la expresión de moléculas bioactivas circulantes relacionadas con procesos emocionales (2-AG y ansiedad), motivacionales (OEA e ingesta), e inflamatorios (aciletanolamidas anti-inflamatorias y quimioquinas pro-inflamatorias). Su asociación con el patrón de consumo, intensidad, comorbilidad asociada y el sexo del paciente invitan a promover este tipo de estudios con el firme objetivo de identificar conjuntos de biomarcadores que ayuden a la comprensión clínica y la orientación terapéutica de estos pacientes. Sin embargo estos estudios son cortes transversales y están muy limitados en su interpretación y aplicabilidad en el momento actual.

Las limitaciones de los estudios clínicos son difíciles de solventar, puesto que al tratarse de estudios con metodología transversal, existe un impedimento importante en el control de factores, tanto internos como externos de los sujetos de estudio, que pueden alterar los niveles de los marcadores biológicos que queremos analizar. Por todo esto, consideramos el estudio multidisciplinar tanto a nivel experimental como clínico, una buena herramienta en el control de estas variables, para dotar a los estudios de investigación el nivel traslacional que se necesita en la mejora terapéutica real. La falta de tratamientos eficaces en el ámbito de los trastornos adictivos, la elevada tasa de recaídas y la necesidad de especialización de los tratamientos según el sexo, hace necesario el estudio de los diferentes sistemas que regulan la homeostasis interna y sus interacciones en el desarrollo de los trastornos adictivos y la comorbilidad psiquiátrica asociada.

6. Conclusiones

- I. La medición objetiva de moléculas circulantes en el plasma de pacientes con trastornos por uso de sustancias puede ayudar a identificar candidatos a biomarcadores tanto de consumo de alcohol como de algunos aspectos específicos relacionados con el patrón de consumo y la gravedad de criterios, así como la comorbilidad psiquiátrica asociada a estos trastornos.
- II. El sexo es determinante en el estudio de los posibles marcadores biológicos de adicción al alcohol y la presencia de comorbilidad psiquiátrica. En la población estudiada, las mujeres con trastornos por uso de alcohol presentan una mayor prevalencia de trastornos afectivos mientras que los hombres muestran una mayor prevalencia de trastornos de la personalidad. Sin embargo, la prevalencia psiquiátrica de estos trastornos mentales en ambos sexos disminuye en ausencia de trastornos comórbidos por uso de otras sustancias.
- III. Las concentraciones plasmáticas de monoacilgliceroles se encuentran alteradas en pacientes con trastornos por uso de alcohol en abstinencia, en relación al diagnóstico de trastornos de ansiedad, de tal modo que se observan concentraciones plasmáticas reducidas de 2-AG y 2-OG.
- IV. Las concentraciones plasmáticas de todas las aciletanolamidas analizadas se encuentran alteradas en pacientes con trastornos por uso de alcohol respecto a controles sanos. De entre estas moléculas destacamos OEA, AEA y DEA que correlacionan negativamente con el tiempo de abstinencia pudiendo establecerse diferentes categorías de mayor o menor duración de la última abstinencia en función de las concentraciones de aciletanolamidas. Este hecho nos permite proponer a la OEA como un biomarcador de abstinencia al alcohol.
- V. Las concentraciones plasmáticas de aciletanolamidas analizadas en pacientes con trastornos por uso de alcohol no se encuentran afectadas por el diagnóstico de otros trastornos psiquiátricos del eje I ni del eje II atendiendo a los criterios diagnósticos del DSM-IV-TR, por lo que estas moléculas no pueden considerarse como biomarcadores de comorbilidad en estas patologías.

- VI.** Las concentraciones plasmáticas de las quimioquinas circulantes SDF-1 y Fractalquina se encuentran reducidas en pacientes con trastornos por uso de alcohol en relación a sujetos controles sanos.
- VII.** El sexo es determinante sobre las concentraciones plasmáticas de determinadas quimioquinas circulantes. Así, las mujeres presentan mayores concentraciones de CCL3 en la población estudio, mientras que si atendemos únicamente a los pacientes con trastornos por uso de alcohol las mujeres muestran concentraciones disminuidas de Eotaxina-1 en relación a los hombres.
- VIII.** Las concentraciones plasmáticas de IL-8 se encuentran elevadas en pacientes con trastornos por uso de alcohol diagnosticadas con comorbilidad médica hepática y presentan concentraciones disminuidas de Eotaxina, pero principalmente en mujeres.
- IX.** Las concentraciones plasmáticas de Eotaxina-1 se encuentran disminuidas en pacientes con trastornos por uso de alcohol psiquiátricos comórbidos, específicamente en trastornos afectivos y de ansiedad, en comparación con los pacientes con trastornos por uso de alcohol sin comorbilidad.
- X.** La exposición a alcohol en modelos animales produce efectos similares a los observados en humanos en la quimioquina SDF-1 por lo que este modelo sería adecuado para estudiar el papel de esta molécula en los trastornos por uso de alcohol. Sin embargo, la exposición a alcohol y a estrés produjo efectos opuestos en Eotaxina-1 en ratas en comparación con los pacientes con trastornos por uso de alcohol. Esto vincula esta quimioquina a la regulación de las respuestas emocionales en un contexto de uso de alcohol, aunque con importantes diferencias de especie.

7. Anexo

7.1. Publicaciones científicas

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha colaborado en distintos trabajos, que han supuesto importantes antecedentes experimentales en la realización de este trabajo, y de los que se han obtenido las siguientes publicaciones:

1. Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavón FJ, Campos Cloute R, Calado M, Ruiz JJ, **García-Marchena N**, Gornemann I, Torrens M, Rodríguez de Fonseca F. (2014). Psychopathological comorbidity in cocaine users in outpatient treatment. *Adicciones*, 26(1):15-26. PMID: 24652395
2. Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, **García-Marchena N**, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Romero P, Suárez J, Baixeras E, de la Torre R, Montesinos J, Guerri C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Martínez-Riera R, Torrens M, Chowen JA, Argente J, Mason BJ, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F.(2015). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 20(4):756-72. doi: 10.1111/adb.12156. Epub 2014 PMID:24854157.
3. Pedraz, M., Araos, P., **García-Marchena, N.**, Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J., Castilla-Ortega, E., Mayoral-Cleries, F., Ruiz, J. J., Pastor, A., Barrios, V., Chowen, J. A., Argente, J., Torrens, M., de la Torre R., Rodríguez de Fonseca, F. & Pavón, F. J. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Frontiers in psychiatry*, 6. doi: 10.3389/fpsyt.2015.00017.
4. Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, **García-Marchena N**, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F. (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol.* 21(4):859-72. doi: 10.1111/adb.12276. Epub 2015 PMID: 26037332

8. Referencias Bibliográficas

- Adler, M. W., Geller, E. B., Chen, X., & Rogers, T. J. (2008). Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *In Drug Addiction* (pp. 127-138). Springer New York.
- Adrian, T. E., Allen, J. M., Bloom, S. R., Ghatel, M. A., Rossor, M. N., Roberts, G. W., Crow, T. J., Tatemoto, K., & Polak, J. M. (1983). Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature*, 306(5943):584-6.
- Afford, S. C., Fisher, N. C., Neil, D. A., Fear, J., Brun, P., Hubscher, S. G. & Adams, D. H. (1998). Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 186, 82-89.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. & Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274(5284), 94-96.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., Gomez-Pinedo, U., Pascual-Lucas, M., Renau-Piqueras, J., Guerri, C. (2012). Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia* 60, 948e964.
- APA. American Psychiatric Association (2000). *Diagnostic criteria from dsM-iv-tr*. American Psychiatric Pub.
- Araos, P., Vergara-Moragues, E., Pedraz, M., Pavón, F. J., Cloute, R. C., Calado, M., Ruiz, J. J., García-Marchena, N., Gornemann, I., Torrens, M. & Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Comorbilidad psicopatológica en consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio. *Adicciones*, 26(1), 15-26.
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plasticity*, 2015, 2015:689404
- Ashton, C. H. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Bri J Psychiatry*, 178, 101-6.
- Ayesta, F. J. (1991). Tolerance and physical dependence: physiological manifestations of chronic exposure to opioids. *In Neurobiology of Opioids* (pp. 387-405). Springer Berlin Heidelberg.
- Ávila Escribano, J. J. & Parra, D. G. (2007). Gender differences in alcoholism. *Adicciones*, 19(4), 383-392.
- Babor, T. F., Higgins-Biddle, J. C., Saunders, J. B., & Monteiro, M. G. (2001). Audit. The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): Guidelines for use in primary care.
- Babor, T. F., Hofmann, M., DelBoca, F. K., Hesselbrock, V., Meyer, R. E., Dolinsky, Z. S., & Rounsaville, B. (1992). Types of alcoholics, I: evidence for an empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity. *Archives of general psychiatry*, 49(8), 599-608.
- Baldwin, G. C., Roth, M. D., & Tashkin, D. P. (1998). Acute and chronic effects of cocaine on the immune system and the possible link to AIDS. *J neuroimmunol*, 83(1), 133-138.
- Banisadr, G., Dicou, E., Berbar, T., Rostene, W., Lombet, & A., Haour, F. (2000). Characterization and visualization of [125I] stromal cell-derived factor-1alpha binding to CXCR4 receptors in rat brain and human neuroblastoma cells. *J. Neuroimmunol*, 110, 151-160.
- Barbosa, I. G., Rocha, N. P., Bauer, M. E., de Miranda, A. S., Huguet, R. B., Reis, H. J., Zunszain, P. A. & Teixeira, A. L. (2013). Chemokines in bipolar disorder: trait or state?. *Eur arch psychiatry clin neurosci*, 263(2), 159-65.
- Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B., & Hungund, B. L. (2000). Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochim Biophys Acta*, 1535(1), 78-86.
- Basavarajappa, B. S. & Hungrund, B. L. (2005). Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol. *Alcohol Alcohol*, 40(1), 15-24.
- Ben-Shabat, S., Fride, E., Sheskin, T., Tamiri, T., Rhee, M. H., Vogel, Z., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. & Mechoulam, R. (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*. 353(1), 23-31.
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53(1), 409-435.
- Bilbao, A., Blanco, E., Luque-Rojas, M. J., Suárez, J., Palomino, A., Vida, M., Araos, P., Bermúdez-Silva, F. J., Fernández-Espejo, E., Spanagel, R., & Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours though a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol*, 18(1), 78-87.
- Bilbao, A., Serrano, A., Cippitelli, A., Pavón, F. J., Guiffreda, A., Suárez, J., García-Marchena, N., Baixeras, E., Gómez de Heras, R., Orió, L., Alén, F., Clccocioppo, R., Cravatt, B. F., Parsons, L. H., Piomelli, D., & Rodríguez de Fonseca, F. (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide

- in alcoholism. *Addict Biol*, 21(4): 859-872.
- Blasco, J., Martínez-Raga, J., Carrasco, E., & Didia-Attas, J. (2008). Atención y craving o ganas compulsivas. Avances en su conceptualización y su implicación en la prevención de recaídas. *Adicciones*, 20(4), 365-376.
- Borsini, A., Heggul, N., Mondelli, V., Chalder, T., & Pariante, C. M. (2014) Childhood stressors in the development of fatigue syndromes: a review of the past 20 years of research. *Psychol Med*, 44,1809-1823.
- Caberlotto, L., Thorsell, A., Rimondini, R., Sommer, W., Hyytiä, P., & Heilig, M. (2001). Differential expression of NPY and its receptors in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcoholism: Clin Exp Res*, 25(11), 1564-1569.
- Caillé, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D. G., & Parsons, L. H. (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *Journal neurosci*, 27(14), 3695-3702.
- Campolongo, P. O., Roozendaal, B., Trezza, V., Cuomo, V., Astarita, G., Fu, J., McGaugh J. L., & Piomelli, D. (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 8027-8031.
- Cándido, A., Orduña, E., Perales, J. C., Verdejo, A., & Billieux, J. (2012). Validación de una versión breve de la escala de comportamiento impulsivo UPPS-P. *Trastornos adictivos*, 14(3), 73-78.
- Cardoso, J. N., Barbosa, A., Ismail, F., & Pombo, S. (2006). NETER alcoholic typology (NAT). *Alcohol Alcohol*, 41(2), 133-139.
- Carvalho, L. A., Bergink, V., Sumaski, L., Wijkhuijs, J., Hoogendijk, W. J., Birkenhager, T. K., & Drexhage, H. A. (2014). Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. *Translational psychiatry*, 4(1), e344.
- Ceccarini, J., De Hert, M., Van Winkel, R., Peuskens, J., Bormans, G., Kranaster, L., Enning, F., Koethe, D., Leweke, F. M., & Van Laere, K. (2013). Increased ventral striatal CB 1 receptor binding is related to negative symptoms in drug-free patients with schizophrenia. *Neuroimage*, 79, 304-312.
- Chiva-Blanch, G., Condines, X., Magraner, E., Roth, I., Valderas-Martinez, P., Arranz, S., Casas, R., Martinez-Huelamo, M., Vallverdu-Queralt, A., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2014). The non-alcoholic fraction of beer increases stromal cell derived factor 1 and the number of circulating endothelial progenitor cells in high cardiovascular risk subjects: a randomized clinical trial. *Atherosclerosis* 233, 518-524.
- Cippitelli, A., Cannella, N., Braconi, S., Duranti, A., Tontini, A., Bilbao, A., Rodríguez de Fonseca, F. & Ciccocioppo, R. (2008). Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. *Psychopharmacology*, 198(4), 449-460.
- Cippitelli, A., Astarita, G., Duranti, A., Caprioli, G., Ubaldi, M., Stopponi, S., Kallupi, M., Sagratini, G., Rodríguez de Fonseca, F., Piomelli, D. & Ciccocioppo, R. (2011). Endocannabinoid regulation of acute and protracted nicotine withdrawal: effect of FAAH inhibition. *PLoS One*, 6(11), e28142.
- Cloninger, C. R., Bohman, M. & Sigvardsson, S. (1981). Inheritance alcohol abuse: cross fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry*, 38(8), 861-862.
- Coller, J. K., & Hutchinson, M. R. (2012). Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther*, 134(2), 219-245.
- Consroe, P. (1998). Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol Dis*, 5(6), 534-551.
- Courtney, K. E. & Polich, J. (2009). Binge drinking in young adults: Data, definitions and determinants. *Psychol Bull*, 135, 142-156.
- Crews, F. T., Zou, J. & Qin, L. (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun*, 25(1), 4-12.
- Członkowska, A., Ciesielska, A., Gromadzka, G., & Kurkowska-Jastrzębska, I. (2006). Gender differences in neurological disease. *Endocrine*, 29(2), 243-256.
- Dannon, P. N., Lowengrub, K., Amiaz, R., Grunhaus, L., & Kotler, M. (2004). Comorbid cannabis use and panic disorder: short term and long term follow-up study. *Human Psychopharmacol*, 19(2), 97-101.
- Desfossés, J., Stip, E., Ait Bentaleb, L., Lipp, O., Chiasson, J. P., Furtos, A., Venne, K., Kouassi, E., & Potvin, S. (2012). Plasma endocannabinoid alterations in individuals with substance use disorder are dependent on the “mirror effect” of schizophrenia. *Front Psychiatry*, 3, 85.

- Devane, W. A., Breuer, A., Sheskin, T., Järbe, T. U., Eisen, M. S. & Mechoulam, R. (1992) A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem*, 35(11), 2065-2069.
- Di Diestelkamp, S., Kriston, L., Arnaud, N., Wartberg, L., Sack, P. M., Härter, M., & Thomasius, R. (2015). Drinking patterns of alcohol intoxicated adolescents in the emergency department: A latent class analysis. *Addict behav*, 50, 51-59.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21(12), 521-528.
- Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., González, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J. A. & Fernández-Ruiz, J. J. (2000). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J neurochem*, 74(4), 1627-1635.
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci*, 99(16), 10819-10824.
- Domenici, E., & Muglia, P. (2007). The search for peripheral disease markers in psychiatry by genomic and proteomic approaches. *Expert Opin Med Diagn*. 1, 235-251.
- Domenici, E., Willé, D. R., Tozzi, F., Prokopenko, I., Miller, S., McKeown, A., Brittain, C., Rujescu, D., Girhlinh, I., Turck, C W., Holsboer, F., Bullmore, E. T., Middleton, L., Merlo-Pich, E., Alexander, R. C., & Muglia, P. (2010). Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*, 5(2), e9166.
- Ellman, L. M., Deicken, R. F., Vinogradov, S., Kremen, W. S., Poole, J. H., Kern, D. M., Tsai, W. Y., Schaefer, C. A., & Brown, A. S. (2010). Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. *Schizophr Res*, 121(1), 46-54.
- Engelhard, C. P., Touquet, G., Tansens, A. & De Fruyt, J. (2015). Alcohol-induced psychotic disorder: a systematic literature review. *Tijdschr Psychiatr*, 57(3), 192-201.
- EMCDDA. European Drug Report 2016: Trends and Developments. Lisbon, May 2016.
- ESTUDES. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2013). Encuesta estatal sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias
- Everitt, B. J. & Robbins, T. W. (2016). Drug Addiction: Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On. *Annu Rev Psychol*, 67, 23-50.
- Ewing, J. A. (1984). Detecting alcoholism: the CAGE questionnaire. *JAMA*, 252(14), 1905-1907.
- Faraone, S. V., & Biederman, J. (2005). What is the prevalence of adult ADHD? Results of a population screen of 966 adults. *J Atten Disord*, 9(2), 384-391.
- Fernández-Ruiz, J., Hernández, M., & Ramos, J. A. (2010). Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther*, 16(3), e72-91.
- Ferrer, B., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Alvarez-Jaimes, L., Sanchez-Vera, I., Giuffrida, A., Serrano, A., Baixeras, E., Khaturia, S., Navarro, M., Parsons, L. H., Piomelli, D. & Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J*, 404(1), 97-104.
- Fride, E., & Mechoulam, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol*, 231(2), 313-314.
- Fonseca-Pedrero, E., Ortuño-Sierra, J., Paino, M., & Muñiz, J. (2016). Experiencias psicóticas atenuadas y consumo de sustancias en universitarios. *Adicciones*.
- Fontenelle, L. F., Barbosa, I. G., Luna, J. V., De Sousa, L. P., Abreu, M. N., & Teixeira, A. L. (2012). A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Compr Psychiatry* 53(6), 797-804.
- Fu, J., Dipatrizio, N. V., Guijarro, A., Schwartz, G. J., Li, X., Gaetani, S., Astarita, G., & Piomelli, D. (2011) Sympathetic activity controls fat-induced oleoylethanolamide signaling in small intestine. *J Neurosci* 31(15), 5730-5736.
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Verme, J. L., Serrano, A., Rodríguez de Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2003). Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 424(6953), 90-93.
- Gaetani, S., Cuomo, V., & Piomelli, D. (2003). Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs?. *Trends in molecular medicine*, 9(11), 474-478
- Gao, B. & Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141, 1572-1585.
- Gil-Bernabe, P., Boveda-Ruiz, D., D'alessandro-Gabazza, C., Toda, M., Miyake, Y., Mifuji-Moroka, R.,

- Iwasa, M., Morser, J., Gabazza, E. C., & Takei, Y. (2011). Atherosclerosis amelioration by moderate alcohol consumption is associated with increased circulating levels of stromal cell-derived factor-1. *Circ J*, 75(9), 2269-2279.
- Giuffrida, A. & Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chem Phys Lipids*, 108(1-2), 51-8.
- Gofman, L., Cenna, J. M., & Potula, R. (2014). P2X4 receptor regulates alcohol-induced responses in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*, 9(5), 668-678.
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides—GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3), 105-111.
- Gómez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D., & Rodríguez de Fonseca, F. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci*, 22(21), 9612-9617.
- González, S., Cascio, M. G., Fernandez-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V., & Ramos J. A. (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954(1), 73-81.
- González, S., Valenti, M., de Miguel, R., Fezza, F., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V., & Ramos J. A. (2004) Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. *Br J Pharmacol*, 143(4), 455-464.
- González-Quintela, A., Dominguez-Santalla, M. J., Perez, L. F., Vidal, C., Lojo, S., & Barrio, E. (2000). Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine*, 2(9), 1437-1440.
- Grant, B. F., Stinson, F. S., Dawson, D. A., Chou, S. P., Ruan, W. J., & Pickering, R. P. (2004). Co-occurrence of 12-Month Alcohol and Drug Use Disorders and Personality Disorders in the United States: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Archives of general psychiatry*, 61(4), 361-368.
- Greenspan, F. S., Gardner, D. G., & Shoback, D. (Eds.). (1997). *Basic & clinical endocrinology* (pp. 192-262). Stamford, CT: Appleton & Lange.
- Griffith, E., Marshall, E. J., & Cook, C. C. (2003). The treatment of Drinking Problems: A guide for the helping professions fourth edition. *Cambridge: Cambridge University Press*, 234-263.
- Guardia, J., Surkov, S. I., & Cardús, M. (2011). Bases neurobiológicas de la adicción. *Manual de Trastornos Adictivos*, 27.
- Guggenhuber, S., Romo-Parra, H., Bindila, L., Leschik, J., Lomazzo, E., Remmers, F., Zimmermann T., Lerner, R., Klugmann, M., Pape, H. C., & Lutz, B. (2015). Impaired 2-AG signaling in hippocampal glutamatergic neurons: aggravation of anxiety-like behavior and unaltered seizure susceptibility. *International Journal of Neuropsychopharmacol*, 19(2), pii: pyv091.
- Guyon, A., Skrzydelski, D., De Giry, I., Rovere, C., Conductier, G., Trocello, J. M., Daugé, V., Kitabgi, P., Rostène, W., Nahon, J. L., & Parsadaniantz, S. M. (2009). Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience*, 162(4), 1072-1080.
- Guzman M, Lo Verme J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor PPAR-alpha. *J Biol Chem*, 279(27), 27849-27854.
- Hall, W., & Solowij, N. (1998). Adverse effects of cannabis. *The Lancet*, 352(9140), 1611-1616.
- Hansen, H. S., Rosenkilde, M. M., Holst, J. J., & Schwartz, T. W. (2012). GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol Sci*, 33(7), 374-381.
- Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137-62.
- Harry, G. J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther*, 139(3), 313-326.
- Hasin, D. S., Goodwin, R. D., Stinson, F. S., & Grant, B. F. (2005). Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*, 62(10), 1097-1106.
- Hasin, D. S., Keyes, K. M., Hatzenbuehler, M. L., Aharonovich, E. A., & Alderson, D. (2007). Alcohol consumption and posttraumatic stress after exposure to terrorism: effects of proximity, loss, and psychiatric history. *Am J Public Health*, 97(12), 2268-2275.
- Hasin, D. S., Liu, X., Nunes, E., McCloud, S., Samet, S. & Endicott, J. (2002). Effects of major depression on remission and relapse of substance dependence. *Arch Gen Psychiatr*, 59(4), 375-378.
- Hasin, D. S., Trautman, K. D., Miele, G. M., Samet, S., Smith, M., & Endicott, J. (1996) Psychiatric

- Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry*, 153(9), 1195-1201.
- Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., Compton, W. M., Croulwy, T., Ling, W., Petry, N. M., Schuckit, M., & Grant, B. F. (2013). DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *Am J Psychiatry*, 170(8), 834-51.
- Hayashi, H. & Sakai, T. (2011). Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(5), G729-738.
- He, J., & Crews, F. T. (2008). Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurology*, 210(2), 349-358.
- Heilig, M., & Murison, R. (1987). Intracerebroventricular neuropeptide Y suppresses open field and home cage activity in the rat. *Regulatory peptides*, 19(3), 221-231.
- Herz, A. (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129(2), 99-111.
- Hesselbrocks, V. & Hesselbrocks, M. (2006). Are there empirically supported and clinically useful subtypes of alcohol dependence? *Addiction*, (Suppl 1), 97-103.
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2009). Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4579-4580.
- Instituto Superior de Estudios Psicológicos (ISEP) (2013) en Hábitos Tóxicos. Psicología clínica y de la Salud. Barcelona.
- Jacobsen, L. K., Southwick, S. M., & Kosten, T. R. (2001). Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry*, 158(8), 1184-90.
- Janca, A., Ustün, T. B., & Sartorius, N. (1994). New versions of World Health Organization instruments for the assessment of mental disorders. *Acta Psychiatr Scand*, 90(2), 73-83.
- Jankowski, M. M., Ignatowska-Jankowska, B., Glac, W., & Swiergiel, A. H. (2010). Cocaine administration increases CD4/CD8 lymphocyte ratio in peripheral blood despite lymphopenia and elevated corticosterone. *Int Immunopharmacol*, 10(10), 1229-1234.
- Jaros, J., Miernik, K., Wąchal, M., Walczak, J., & Kruppl, G. (2013). Naltrexone (50 mg) plus psychotherapy in alcohol-dependent patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 39(3), 144-60.
- Jean-Gilles, L., Feng, S., Tench, C. R., Chapman, V., Kendall, D. A., Barrett, D. A., & Constantinescu, C. S. (2009). Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *Journal Neurological Sci*, 287(1), 212-215.
- Jellinek, E. M. (1961). The disease concept of alcoholism. *New Haven: College & University Press*.
- Jenniches, I., Ternes, S., Albayram, O., Otte, D. M., Bach, K., Bindila, L., Michel, K., Lutz, B., Bilkei-Gorzo, A., & Zimmer, A. (2016). Anxiety, stress, and fear response in mice with reduced endocannabinoid levels. *Biol Psychiatry*, 79(10), 858-868.
- Jiang, R., Hu, F. B., Giovannucci, E. L., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Spiegelman, D., Rosner, B. A., & Willett, W. C. (2003). Joint association of alcohol and folate intake with risk of major chronic disease in women. *Am J Epidemiol*, 158(8), 760-771.
- Kane, C. J., Phelan, K. D., Douglas, J. C., Wagoner, G., Johnson, J. W., Xu, J., Phelan, P. S., & Drew, P. D. (2014). Effects of Ethanol on Immune Response in the Brain: Region-Specific Changes in Adolescent Versus Adult Mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 38(2), 384-391.
- Kask, A., Kivastik, T., Rågo, L., & Harro, J. (1999). Neuropeptide YY 1 receptor antagonist BIBP3226 produces conditioned place aversion in rats. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*, 23(4), 705-711.
- Khantzian, E. J. (1997). The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harv Rev Psychiatry*, 4(5), 231-244.
- Kendler, K. S., Jacobson, K. C., Prescott, C. A., & Neale, M. C. (2003). Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins. *Am J Psychiatry*, 160(4), 687-695.
- Kessler, R. C., Crum, R. M., Warner, L. A., Nelson, C. B., Schulenberg, J., & Anthony, J. C. (1997). Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 54(4), 313-321.
- Kessler, R. C., & Ustün, T. B. (2004). The word mental health (WMH) survey initiative version of the world health organization (WHO) composite international diagnostic interview (CIDI). *Int J Methods in Psychiatr Res*, 13(2), 93-121.
- Keyes, K. M., Martins, S. S., Blanco, C., Hasin, D. S. (2010). Telescoping and gender differences in alcohol dependence: new evidence from two national surveys. *Am J Psychiatry*, 167(8): 969-

- Kinsey, S. G., O'Neal, S. T., Long, J. Z., Cravatt, B. F., & Lichtman, A. H. (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behavior*, 98(1), 21-27.
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., O'Dell, L. E., Parsons, L. H & Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci & Biobehav Rev*, 27(8), 739-749.
- Koob, G. F. (2013). Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Curr Opin Neurobiol*, 23(4), 559-563.
- Koob G. F. & Volkow, N. D. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-38.
- Koppel, J., Bradshaw, H., Goldberg, T. E., Khalili, H., Marambaud, P., Walker, M. J., Pazos, M., Gordon, M. L., Christen, E., & Davies, P. (2009). Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. *Lipids Health Dis*, 8, 2.
- Landheim, A. S., Bakken, K., & Vaglum, P. (2006). Impact of comorbid psychiatric disorders on the outcome of substance abusers: a six year prospective follow-up in two Norwegian counties. *BMC Psychiatry*, 6, 44.
- Larsson, A., Carlsson, L., Gordh, T., Lind, A. L., Thulin, M., & Kamali-Moghaddam, M. (2015). The effects of age and gender on plasma levels of 63 cytokines. *J Immunol Methods*, 425, 58-61.
- Lesch, O. M., Dietzel, M., Musalek, M., Walter, H. & Zeiler, K. (1988). The course of alcoholism. Long-term prognosis in different types. *Forensic Sci Int*, 36(1), 121-138.
- Lewis, M. J. & June, H. L. (1990). Neurobehavioral studies of ethanol reward and activation. *Alcohol*, 7(3), 213-219.
- Liu, I. C., Blacker, D. L., Xu, R., Fitzmaurice, G., Lyons, M. J., & Tsuang, M. T. (2004). Genetic and environmental contributions to the development of alcohol dependence in male twins. *Arch Gen Psychiatry*, 61(9), 897-903.
- López, A., & Becoña, E. (2006). El craving en personas dependientes de la cocaína. *Anales de Psicología*, 22(2), 205-211.
- LoVerme, J., La Rana, T., Russo, R., Carlignano, A., & Piomelli, D. (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*. 77(14), 1685-98.
- Lynam, D. R., Smith, G. T., Whiteside, S. P., & Cyders, M. A. (2006). The UPPS-P: Assessing five personality pathways to impulsive behavior. *West Lafayette, IN: Purdue University*
- Magalhaes, P. V., Jansen, K., Stertz, L., Ferrari, P., Pinheiro, R. T., da Silva, R. A., & Kapczinski, F. (2014). Peripheral eotaxin-1 (CCL11) levels and mood disorder diagnosis in a population-based sample of young adults. *J Psychiatr Res*, 48(1), 13-15.
- Malet, L., Llorca, P. M., Boussiron, D., Schwan, R., Facy, F. & Reynaud, M. (2003). General Practitioners and alcohol use disorders: quantity without quality. *Alcohol Clin Expr Res*, 27(1), 61-66.
- Malinen, H., Lehtonen, M. & Hyttiä, P. (2009). Modulation of brain endocannabinoid levels by voluntary alcohol consumption in alcohol-preferring AA rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 33(10), 1711-1720.
- Mandyam, C. D., & Koob, G. F. (2012). The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci*, 35(4), 250-260.
- Mangieri, R., Hong, K. A., Piomelli, D. & Sinha, R. (2009). An endocannabinoid signal associated with desire for alcohol is suppressed in recently abstinent alcoholics. *Psychopharmacology*, 205(1), 63-72.
- Martz, A., Dietrich, R. A., & Harris, R. A. (1983). Behavioral evidence for the involvement of γ -aminobutyric acid in the actions of ethanol. *Eur J Pharmacology*, 89(1-2), 53-62.
- Mayfield, J., Ferguson, L., & Harris, R. A. (2013) Neuroimmune signaling: a key component of alcohol abuse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 513e520.
- Merikangas, K. R., Mehta, R. L., Molnar, B. E., Walters, E. E., Swendsen, J. D., Aguilar-Gaziola, S., Bijil, R., Borges, G., Caraveo-Anduaga, J. J., DeWit, D. J., Kolody, B., Vega, W. A., Wittchen, H. U. & Kessler, R. C. (1998). Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the international consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addic Behav*, 23(6), 893-907.
- Merlo-Pich, E., Lorang, M., Yeganeh, M., Rodriguez de Fonseca, F., Raber, J., Koob, G. F., Weiss, F. (1995). Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured

- by microdialysis. *J Neurosci*, 15(8), 5439-47.
- Monteleone, P., Tortorella, A., Martiadis, V., Di Filippo, C., Canestrelli, B., & Maj, M. (2008). The cDNA 385C to A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is associated with overweight/obesity but not with binge eating disorder in overweight/obese women. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 546-550.
- Moreau, J. L., Kilpatrick, G., & Jenck, F. (1997). Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *Neuroreport*, 8(7), 1697-1701.
- Morguello, S., Holzer, C. E., Ryan, E., Young, C., Naseer, M., Castellon, S. A., Frol, A. B., Atkinson, J. H., Gelman, B. B., Grant, I. & Singer, E. J. (2006). Interrater reliability of the Psychiatric Research Interview for Substance and mental Disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS Tissue Consortium. *Int J Methods Psychiatric Res*, 15(3), 131-138.
- Mu, H., & Høy, C. E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, 43(2), 105-133.
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R. M., del Arco, I., Villanúa, M. A., Carrera, M. R. & Rodríguez de Fonseca, F. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*, 8(2), 491-496.
- Nurnberger, J. I., Wiegand, R., Bucholz, K., O'Connor, S., Meyer, E. T., Reich, T., Rice, J., Schuckit, M., King, L., Petti, T., Bierut, L., Hinrichs, A. L., Kuperman, S., Hesselbrock, V., & Porjesz, B. (2004). A family study of alcohol dependence: coaggregation of multiple disorders in relatives of alcohol-dependent probands. *Arch Gen Psychiatry*, 61(12), 1246-1256.
- Nutt, D. J. The role of the opioid system in alcohol dependence. (2014). *J Psychopharmacol*, 28(1), 8-22.
- O'Brien C. P. (2012). Rationale for changes in DSM-5. *J Stud Alcohol Drugs*, 73(4), 705.
- OEDT. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2013). Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Plan Nacional sobre drogas, Ministerio de Sanidad Servicios sociales e Igualdad. España.
- OEDT. Observatorio Español de las Drogas y las Toxicomanías (2014). Encuesta 2013-2014 sobre consumo de sustancias psicoactivas en el ámbito laboral en España. Plan Nacional sobre drogas, Ministerio de Sanidad Servicios sociales e Igualdad. España.
- Ogłodek, E. A., Szota, A., Just, M. J., Mos, D., & Araszkiewicz, A. (2014). Comparison of chemokines (CCL-5 and SDF-1), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4) and IL-6 levels in patients with different severities of depression. *Pharmacol Rep* 66, 920-926.
- Ogłodek, E. A., Szota, A. M., Just, M. J., Mos, D. M., & Araszkiewicz, A., (2015). The MCP-1, CCL-5 and SDF-1 chemokines as pro-inflammatory markers in generalized anxiety disorder and personality disorders. *Pharmacol Rep* 67, 85-89.
- Olive, M. F., Mehmert, K. K., Koenig, H. N., Camarini, R., Kim, J. A., Nannini, M. A., Ou, C. J. & Hodge, C. W. (2003). A role for corticotropin releasing factor (CRF) in ethanol consumption, sensitivity, and reward as revealed by CRF-deficient mice. *Psychopharmacology*, 165(2), 181-187.
- Orio, L., Pavon, F. J., Blanco, E., Serrano, A., Araos, P., Pedraz, M., Rivera, P., Calado, M., Suárez, J. & Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr Pharm Des*, 19(40), 7036-7049.
- Palpacuer, C., Laviolle, B., Boussageon, R., Reymann, J. M., Bellissant, E., & Naudet, F. (2015). Risks and Benefits of Nalmefene in the Treatment of Adult Alcohol Dependence: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Published and Unpublished Double-Blind Randomized Controlled Trials. *PLoS Med*, 12(12):e1001924.
- Panizzutti, B., Gubert, C., Schuh, A. L., Ferrari, P., Bristot, G., Fries, G. R., Massuda, R., Waiz, J., Rocha, N. P., Berk, M., Teixeira, A. L. & Gama, C. S. (2015). Increased serum levels of eotaxin/CCL11 in late-stage patients with bipolar disorder: An accelerated aging biomarker?. *J Affective Disord*, 182, 64-69.
- Pavón, F. J., Araos, P., Pastor, A., Calado, M., Pedraz, M., Campos-Cloute, R., Ruiz, J. J., Serrano, A., Blanco, E., Rivera, P., Suárez, J., Romero-Cuuevas, M., Pujadas, M., Vergara-Moragues, E., Gonemman, I., Torrens, M., de la Torre, R., & Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol*, 18(6), 955-969.
- Pavon, F. J., Marco, E. M., Vázquez, M., Sánchez, L., Rivera, P., Gavito, A., Mela, V., Alén, F., Decara, J., Suárez, J., Giné, E., López-Moreno, J. A., Chowen, J., Rodríguez de Fonseca, F., Serrano, A., & Viveros, M. P. (2016). Effects of Adolescent Intermittent Alcohol Exposure on the Expression of Endocannabinoid Signaling-Related Proteins in the Spleen of Young Adult Rats. *PLoS One*, 11(9), e0163752

- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333(6048), 1456–1458.
- Paolicelli, R. C., Bisht, K., & Tremblay, M. È. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci*, 8, 129.
- Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C. M. & Guerri, C., (2015). Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*, 89, 352-359.
- Pastor, A., Farré, M., Fitó, M., Fernandez-Aranda, F., & de La Torre, R. (2014). Analysis of ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J Lip Res*, 55(5), 966-977.
- Patel, S., Rademacher, D. J., & Hillard, C. J. (2003). Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 306(3), 880-888.
- Pedraz, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J., Castilla-Ortega, E., Mayoral-Claries, F., Ruiz, J. J., Pastor, A., Barrios, V., Chowen, J. A., Argente, J., Torrens, M., de la Torre, R., Rodríguez de Fonseca, F., & Pavón, F. J. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Front Psychiatry*, 16(6), 17
- Pertwee, R. G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem*, 17(14), 1360-1381.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4(11): 873-84
- Pombo, S., & Lesch, O. M. (2009). The alcoholic phenotypes among different multidimensional typologies: similarities and their classification procedures. *Alcohol and Alcohol*, 44(1), 46-54.
- Ponce, G., Jimenez-Arriero, M. A., Rubio, G., Hoenicka, J., Ampuero, I., Ramos, J. A., & Palomo, T. (2003). The A1 allele of the DRD2 gene (Taql A polymorphisms) is associated with antisocial personality in a sample of alcohol-dependent patients. *Euro Psychiatry*, 18(7), 356-360.
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological psychiatry*, 63(8), 801-808.
- Quercioli, A., Pataky, Z., Vincenti, G., Makoundou, V., Di Marzo, V., Montecucco, F., Carballo, S., Thomas, A., Staub, C., Steffens, S., Seimille, Y., Golay, A., Ratib, O., Harsch, E., Mach, F., & Schindler, T. H. (2011). Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J*, 32(11), 1369-1378.
- Rasmussen, P., & Gillberg, C. (2000). Natural outcome of ADHD with developmental coordination disorder at age 22 years: a controlled, longitudinal, community-based study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39(11), 1424-1431.
- Regier, D. A., Farmer, M. E., Rae, D. S., Locke, B. Z., Keith, S. J., Judd, L. L., & Goodwin, F. K. (1990). Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* 264(19), 2511-2518.
- Reyes-Cabello, C., Alen, F., Gómez, R., Serrano, A., Rivera, P., Orio, L., Rodríguez de Fonseca, F., & Pavón, F. J. (2012). Effects of the anandamide uptake blocker AM404 on food intake depend on feeding status and route of administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 101(1), 1-7.
- Rivera, P., Pérez-Martin, M., Pavón, F. J., Serrano, A., Crespillo, A., Cifuentes, M., López-Ávalos, M. D., Grondona, J. M., Vida, M., Fernández-Llebrez, P., Rodríguez de Fonseca, F., & Suárez, J. (2013). Pharmacological administration of the isoflavone daidzein ehances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PloS One*, 8(5).
- Rivier, C., & Vale, W. (1987). Cocaine stimulates adrenocorticotropin (ACTH) secretion through a corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated mechanism. *Brain research*, 422(2), 403-406.
- Roberts, C. J., Stuhr, K. L., & Hillard, C. J. (2012). Swim stress differentially affects limbic contents of 2-arachidonoylglycerol and 2-oleoylglycerol. *Neuroscience*, 204, 74-82.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev*, 18(3), 247-291.
- Rodríguez de Fonseca, F. (2004). Sistema endocannabinoide y control de la ingesta. *Rev Med Univ Navarra*, 48(2), 18-23.
- Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M. R., Navarro, M., Koob, G. F., & Weiss, F. (1997). Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, 276(5321), 2050-2054.

- Rodríguez de Fonseca, F., del Arco, I., Bermúdez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcohol*, 40(1), 2-14.
- Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodríguez, E., Guiffrida, A., LoVerme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C., & Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414(6860), 209-212.
- Rodríguez-Jiménez, R., Ponce, G., Monasor, R., Jiménez-Giménez, M., Pérez-Rojo, J. A. & Rubio, G. (2001). Validación en población española adulta de la Wender-Utah Rating Scale para la evaluación retrospectiva de trastorno por déficit de atención e hiperactividad en la infancia. *Rev Neurol*, 33(138), 44.
- Ross, H. E. (1995). DSM-III-R alcohol abuse and dependence and psychiatric comorbidity in Ontario: results from the Mental Health Supplement to the Ontario Health Survey. *Drug Alcohol Depend*, 39(2), 111-128.
- Rubio, M., McHugh, D., Fernandez-Ruiz, J., Bradshaw, H., & Walker, J. M. (2007) Short-term exposure to alcohol in rats affects brain levels of anandamide, other N-acyl ethanolamines and 2-arachidonoyl-glycerol. *Neurosci Lett* 421,270-274.
- Rubio, M., de Miguel, R., Fernández-Ruiz, J., Gutierrez-Lopez, D., Carai, M. A., & Ramos, J. A. (2009). Effects of a short-term exposure to alcohol in rats on FAAH enzyme and CB1 receptor in different brain areas. *Drug Alcohol Depend* 99,354-358.
- Sáez, C. G., Olivares, P., Pallavicini, J., Panes, O., Moreno, N., Massardo, T., Mezzano, D. & Pereira, J. (2011). Increased number of circulating endothelial cells and plasma markers of endothelial damage in chronic cocaine users. *Thromb Res* 128, e18-23.
- Salim, P. H., Jobim, M., Bredemeier, M., Chies, J. A., Brenol, J. C., Jobim, L. F., & Xavier R. M. (2012). Combined effects of CXCL8 and CXCR2 gene polymorphisms on susceptibility to systemic sclerosis. *Cytokine*, 60(2), 473-477.
- Salom, C. L., Betts, K. S., Williams, G. N., Najman, J. N., Scott, J. G. & Alati, R. (2014). Do young people with comorbid mental and alcohol disorders experience worse behavioral problems? *Psychiatry Res*, 219(2), 372-379.
- Semple, B. D., Kossmann, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(3), 459-473.
- Solomon, R. L., & Corbit, J. D. (1974). An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychological Rev*, 81(2), 119.
- Spanagel R (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev*, 89(2), 649-705.
- Schuckit, M. A., & Smith, T. L. (2000). The relationships of a family history of alcohol dependence, a low level of response to alcohol and six domains of life functioning to the development of alcohol use disorders. *J Studies Alcohol*, 61(6), 827-835.
- Serrano, A. & Parsons, L. H. (2011) Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther*, 132(3), 215-41.
- Serrano, A., Rivera, P., Pavón, F. J., Decara, J., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F. & Parsons, L. H. (2012). Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcohol Clin Exp Res*, 36(6), 984-994.
- Silvestri, C., & Di Marzo, V. (2013). The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell metabolism*, 17(4), 475-490.
- Sinha, R., Fox, H. C., Hong, K. A., Bergquist, K., Bhagwager, Z., & Siedlarz, K. M. (2009). Enhanced negative emotion and alcohol craving, and altered physiological responses following stress and cue exposure in alcohol dependent individuals. *Neuropsychopharmacology*, 34(5), 1198-1208.
- Skrzydelski, D., Guyon, A., Dauge, V., Rovere, C., Apartis, E., Kitabgi, P., Nahon, J. L., Rostene, W., & Parsadaniantz, S. M. (2007). The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. *J. Neurochem*. 102, 1175-1183.
- Stark, R., Bauer, E., Merz, C. J., Zimmermann, M., Reuter, M., Plichta, M. M., Kirsch, P., Lesch, k. P, Fallgatter, A. J., Vaitl, D., & Herrmann, M. J. (2011). ADHD related behaviors are associated with brain activation in the reward system. *Neuropsychologia*, 49(3), 426-434.
- Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773-778.

- Stuart, M. J. & Baune, B. T. (2014) Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev* 42,93–115.
- Suwaki, H., Kalant, H., Higuchi, S., Crabbe, J. C., Ohkuma, S., Katsura, M., yoshimura, M., Ateewart, R. C., Li, T. K., & Weiss, F. (2001). Recent research on alcohol tolerance and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*,25(5supplSBRA), 189S-196S.
- Swiątkowska-Stodulska, R., Bąkowska, A., & Drobińska-Jurowiecka, A. (2006). Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Medical Sci Mon*,12(5), CR215-CR220.
- Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J., & Kandefer-Zerszen, M. (2000). Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*,48(4), 301-307.
- Targowski, T., Janz-Rozyk, K., Plusa, T., & Glodzinska-Wyszogrodzka, E. (2005). Influence of age and gender on serum eotaxin concentration in healthy and allergic people. *J Invest Aller Clin Immuno*, 15(4), 277.
- Teixeira, A. L., Reis, H. J., Nicolato, R., Brito-Melo, G., Correa, H., Teixeira, M. M. & Romano-Silva, M. A. (2008). Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*,32(3), 710-714.
- Téllez, L. A., Medina, S., Han, W., Ferreira, J. G., Licona-Limón, P., Ren, X., Lam, T. T., Schwartz, G. J., & de Araujo, I. E. (2013). A gut lipid Messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science*,341(6147), 800-802.
- Thiele, T. E., Marsh, D. J., Marie, L. S., Bernstein, I. L., & Palmiter, R. D. (1998). Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature*,396(6709), 366-369.
- Tiffany, S. T., & Conklin, C. A. (2000). A cognitive processing model of alcohol craving and compulsive alcohol use. *Addiction*,95(8supp2), 145-153.
- Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Perez-Dominguez, G., & Martin-Santos, R. (2004) Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry*,161(7),1231–1237.
- Tournier, M., Sorbara, F., Gindre, C., Swendsen, J. D., & Verdoux, H. (2003). Cannabis use and anxiety in daily life: a naturalistic investigation in a non-clinical population. *Psychiatry Res*,118(1), 1-8.
- Trecki, J., & Unterwald, E. M. (2009). Modulation of cocaine-induced activity by intracerebral administration of CXCL12. *Neuroscience*,161(1), 13-22.
- Uchida, M., Ito, T., Nakamura, T., Igarashi, H., Oono, T., Fujimori, N., Kawabe, K., Suzuki, K., Jensen, R.T., and Takayanagi, R. (2013). ERK pathway and sheddases play an essential role in ethanol-induced CX3CL1 release in pancreatic stellate cells. *Lab Invest*,93(1), 41-53.
- Umhau, J. C., Schwandt, M., Solomon, M. G., Yuan, P., Nugent, A., Zarate, C. A., Drevets, W. C., Hall, S. D., George, D. T., & Heilig, M. (2014). Cerebrospinal Fluid Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Alcoholics: Support for a Neuroinflammatory Model of Chronic Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*, 38(5), 1301-1306.
- Vallés, S. L., Blanco, A. M., Pascual, M., & Guerri, C. (2004). Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*,14(4), 365-371.
- Vega Astudillo, P (2015). Evidencias y herramientas para abordar pacientes con trastornos relacionados con el alcohol. Comorbilidad Psiquiátrica. SERGAS.
- Verdejo-García, A., Lozano, O., Moya, M., Alcázar, M. A., & Pérez-García, M. (2010). Psychometric properties of a spanish version of the UPPS-P impulsive behavior scale: Reliability, validity and association with trait and cognitive impulsivity. *J Personality Assess*, 92(1), 70-77.
- Vergara-Moragues, E., González-Saiz, F., Lozano, O. M., Betanzos, P., Fernández, F., Bilbao-Acebos, I., Pérez, M., & Verdejo, A. (2012). Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community: Substance-induced versus independent disorders. *Psychiatry Res*,200(2-3), 734-41.
- Verheul, R. & Van den Brink, W. (2000) The role of personality pathology in the etiology and treatment of substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry*,13, 163-9.
- Viganò, D., Grazia, Cascio, M., Rubino, T., Fezza, F., Vaccani, A., Di Marzo, V., & Parolaro, D. (2003). Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. *Neuropsychopharmacology*,28(6), 1160-1167.
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J. S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Peskind, E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., Galasdo, D. R., Xie, X. S., & Rando, T. A. (2011). The ageing systemic milieu

- negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90-94.
- Volkow, N. D., & Li, T. K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 963-970.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Kollins, S. H., Wigal, T. L., Newcorn, J. H., & Telang, F. (2009) Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *JAMA*, 302(10), 1084-91.
- Ward, M. F. (1993). The Wender Utah Rating Scale: An Aid in the Retrospective. *Am J Psychiatry*, 150, 885.
- Weisner, C. & Matger, H. (2003). Missed oportunities in addressing drinking behaviour in medical and mental health services. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(7), 1132-1141.
- Weiss, F., Lorang, M. T., Bloom, F. E., & Koob, G. F. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther*, 267(1), 250-258.
- Westin, K., Buchhave, P., Nielsen, H., Minthon, L., Janciauskiene, S., & Hansson, O. (2012). CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(1), e30525.
- Wilens, T. E., & Spencer, T. J. (2010). Understanding attention-deficit/hyperactivity disorder from childhood to adulthood. *Postgrad Med*, 122(5), 97-109.
- Wilens, T. E., & Upadhyaya, H. P. (2007). Impact of substance use disorder on ADHD and its treatment. *J Clin Psychiatry*. 68(8), e20.
- Wilsnack, S. C., Wilsnack, R. W., & Hiller-Sturnhöfel, S. (1994). How women drink: Epidemiology of women's drinking and problema drinking. *Alcohol Res Health*, 18(3), 173.
- Wilson, S. T., Fertuck, E. A., Kwitel, A., Stanley, M. C., & Stanley, B. (2006). Impulsivity, suicidality and alcohol use disorders in adolescents and young adults with borderline personality disorder. *International J Adolesc Med health*, 18(1), 189-196.
- WHO. World Health Organization. (1992). CIE 10: Trastornos mentales y del comportamiento: descripciones clínicas y pautas para el diagnóstico.
- WHO. World Health Organization. (2002). The world health report. Reducing risks, promoting healthy life.
- WHO. World Health Organization (2014). Global status report on alcohol and health.
- WHO. World Health Organization (2010). European status report on alcohol and health.
- Wu, D., Zhou, J., Bi, H., Li, L., Gao, W., Huang, M., Adcock, i. M., Barnes, P. J. & Yao, X. (2014). CCL11 as a potential diagnostic marker for asthma?. *J Asthma*, 51(8), 847-854.
- Yasuda, K., Miyake, K., Horikawa, Y., Hara, K., Osawa, H., Furuta, H., Hirota, Y., Mori, H., Jonsson, A., Sato, Y., Yamagata, K., Hinokio, Y., Wang, H., Tanahashi, T., Nakamura, N., Oka, Y., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Seino, Y., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Takeda, J., Maeda, E., Shin, H. D., Cho, Y. M. Park, K. S., Lee, H. K., Ng, M. C., Ma, R. C., So, W. Y., Chan, J. C., Lyssenko, V., Tuomi, T., Nilsson, P., Groop, L., Kamatani, N., Sekine, A., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Yoshida, T., Tokunaga, K., Itakura, M., Makino H., Nanjo, K., Kadowaki, T., & Kasuga, M (2008). Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, 40(9), 1092-1097.
- Zhang, X. Y., Zhou, D. F., Cao, L. Y., Zhang, P. Y., Wu, G. Y., Shen, Y. C. (2004) Changes in serum interleukin-2, -6, and -8 levels before and during treatment with risperidone and haloperidol: relationship to outcome in schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 65(7), 940-947.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452-457.